

Abstract not available for KR2002004495

Abstract of correspondent: US2002128438

The present invention relates to the construction of a TRAIL DNA cassette for the production of a secretable trimeric rTRAIL, the development of pCMVdw vectors and pAAVdw vectors harboring a feed-forward amplification loop type Tet-On system that can be packaged into AAV particles, the preparation of a recombinant vectors by the combination of the TRAIL DNA cassette and the two vectors, and the treatment of diseases including cancer using such vectors. The present invention provides a TRAIL DNA cassette comprising a secretion signal (SS) sequence, a trimer-forming domain (TFD) and a TRAIL(114-281) coding cDNA. The TRAIL cassette thus constructed can be cloned into an appropriate expression vector, and subsequently used in the mass production of a secretable recombinant trimeric TRAIL protein or administered to a patient for a gene therapy.

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청 (KR) (12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. 7
C12N 15/09

(11) 공개번호 특2002 - 0004495
(43) 공개일자 2002년01월16일

(21) 출원번호 10 - 2000 - 0038441
(22) 출원일자 2000년07월06일

(71) 출원인 설대우
경남 거제시 일운면 망치리 428 - 2

(72) 발명자 설대우
경남 거제시 일운면 망치리 428 - 2
빌리알 알 티모시
미합중국 피에이 15261, 피츠버그, 유니버시티 오브 피츠버그 스쿨오브메디슨, 디파트먼
트 오브 서저리, 에프 - 1281.3 피유에이취

(74) 대리인 김동진
박형근
이근형

심사청구 : 있음

(54) 분비성 재조합 트라이머형의 트레일 단백질 생산을 위한디엔에이 카세트, 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성아데노 - 관련 바이러스 벡터, 이 둘의 조합, 및 이들을이용한 유전자 치료

요약

본 발명은 분비가능한 트라이머 rTRAIL의 생성을 위한 TRAIL DNA 카세트의 구성, pCMVdw 벡터 및 AAV 입자에 패키징 될 수 있는 피드 - 포워드 증폭 루프 방식의 Tet - On 시스템을 장착한 pAAVdw 벡터의 개발, TRAIL DNA 카세트와 이들 두 벡터의 조합에 의한 재조합 벡터 제조, 및 이들 벡터를 이용한 암 등의 치료에 관한 것이다.

본 발명은 분비 시그날 서열(SS), 트라이머 형성 도메인(TFD) 및 TRAIL(114 - 281) 암호 cDNA로 구성되는 TRAIL DNA 카세트를 하나의 특징으로 한다.

이와 같이 구성된 본 발명의 TRAIL 카세트는 적절한 발현 벡터에 클로닝되어 분비성 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질의 대량 생산에 이용되거나 유전자 치료를 위하여 직접 환자의 체내로 투여될 수 있다.

대표도
도 10a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 세포내에서 생성된 단백질의 분비를 위한 분비시그널로서 인간 피브릴린 - 1으로부터 유래된 SEC2 핵산서열 및 아미노산 서열을 나타낸다.

도 1b는 세포내에서 생성된 단백질의 분비를 위한 분비시그널로서 인간 성장 호르몬으로부터 유래된 SEC(CV) 서열로, 분비시그널의 절단 용이성을 위하여 SEC(CV)의 C 말단에 푸린(Furin) - 특이적 절단 서열을 추가하였다.

도 2는 푸린(Furin) - 특이적 절단 부위 서열을 나타내며, 절단부위는 화살표로 나타내었다.

도 3은 트라이머 형성 도메인인 ILZ의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 4는 인간 TRAIL cDNA(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 5는 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터에 의해 유도되는 포유류의 발현벡터인 pCMVdw 벡터의 다중클로닝 부위의 핵산서열이다.

도 6은 FLAG - tag의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 7은 His - tag의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8a는 SEC2ILZ 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8b는 HisTRAIL(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8c는 SEC2TRAIL(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8d는 FLAGILZTRAIL(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8e는 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8f는 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)의 핵산서열 및 아미노산 서열이다.

도 8g는 도8a 부터 도8f의 서열들을 각각 또는 혼합하여 pCMVdw벡터에 삽입하여 만들어진 발현벡터와 HeLa 세포사멸활성을 시험한 결과표 및 세포사멸결과를 보여주는 사진이다.

도 9a는 SEC2 분비 시그널을 함유한 TRAIL 단백질의 발현과 분비를 보여주는 표준 웨스턴 블롯 분석 사진이다.

도 9b는 SEC(CV) 분비 시그널을 함유한 TRAIL 단백질의 발현, 분비 및 절단을 나타내는 표준 웨스턴 블롯 분석 사진이다.

도 10a는 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 pAAVdw 벡터를 구축하는 과정을 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 10b는 pAAVdw 벡터의 " TetO - mP" 에 대응하는 pTRE 벡터의 핵산서열이다

도 10c는 pAAVdw 벡터의 좌측 " TetO - mP" 의 핵산서열이다

도 10d는 pAAVdw 벡터의 우측 " TetO - mP" 의 핵산서열이다

도 10e는 pAAVdw 벡터의 rtTA의 핵산서열이다

도 10f는 pAAVdw 벡터의 TetO - mP - rtTA의 핵산서열이다

도 10g는 pAAVdw 벡터에서 표적 유전자(gfp)의 피드 - 포워드 증폭발현의 원리를 보여주는 개념도이다.

도 10h는 pAAVdw 벡터에서 표적유전자(gfp)의 테트라사이클린 유도성을 보여주는 GFP - 인식항체를 이용한 웨스턴 블롯 사진이다.

도 11a는 분비성 트라이머형 TRAIL 생성을 위한 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 pAAVdw - TRAIL 벡터를 구축하는 과정을 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 11b는 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)과 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) 벡터의 시험결과표이다.

도 12는 분비성 트라이머형 TRAIL 생성을 위한 DNA 카세트와 피드 - 포워드 증폭 루프 방식의 Tet - On 시스템을 장착한 AAV 입자의 활성 시험결과표이다.

도 13은 액티노마이신 D(ActD)가 TRAIL 유도성 어팍토시스를 증가시키는 것을 보여주는 표적세포사멸 시험결과표이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

프로그램된 세포 사멸로 알려진 어팍토시스(apoptosis)는 진화적으로 보존되고 유전적으로 조절되는 생물학적 과정이며, 다세포성 유기체의 발생 및 항상성에서 중요한 역할을 한다(Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation.Science281, 1305 - 1308 (1998). Nagata, S. Apoptosis by death factor.Cell88, 355 - 365 (1997). Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis.Cell91, 443 - 446 (1997)).

어팍토시스는 생리학적 및 병원생리학적 환경 둘 다에서 일어난다. 어팍토시스의 조절이 해제되면, 종종 질병이 일어난다(Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.Science267, 1456 - 1462 (1995). Rimon, G., Bazenet, C.E., Philpott, K.L. & Rubin, L.L. Increased surface phosphatidylserine is an early marker of neuronal apoptosis.J. Neurosci. Res.48, 563 - 570 (1997). Krams, S.M. & Martinez, O.M. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in liver allograft rejection.Semin. Liver Dis.18, 153 - 167 (1998). Olivetti, G.et al.Apoptosis in the failing human heart.N. Engl. J. Med.336, 1131 - 1141 (1997). Darzykiewicz, Z. Apoptosis in antitumor strategies: Modulation of cell cycle or differentiation.J. Cell. Biol.58, 151 - 159 (1995)) 과다한 어팍토시스와 관련된 질병은 AIDS, 신경변성 질병(알츠하이머 병), 허혈/재관류 손상, 심근병증에서 심장 부전의 진행, 바이러스 감염(만성 간염), 독소 유도된 간 질환 및 기관 이식 거부를 포함한다.

너무 적은 어팍토시스와 관련된 질병은 암 및 자가 면역 질환을 포함한다.

어팍토시스를 유도하는 인자는 많은 것들이 알려져 있으나, 생체가 생성하여 생리적 현상으로서 어팍토시스를 유도하는 인자로 TNF - α , FasL(Fas 리간드), TRAIL(Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand) 등이 알려져 있으며, 최근 들어 어팍토시스 기작을 이용한 암 등의 난치병 치료에 대한 연구가 활발하다.

TNF- α 에 의해 유도되는 어팍토시스 신호 경로에서, TNF- α 의 결합에 의한 TNF- α 수용체인 TNF-R1의 활성화는 세포의 어댑터(adaptor) 단백질 TRADD(Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D.V. The TNF receptor 1 - associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*81, 495 - 504 (1995))가 활성화된 TNF-R1에 보충되도록 한다. TRADD는 FADD, TNF 수용체 - 관련 인자 - 2(TRAF-2) (Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M. G. & Goeddel, D.V. TRADD - TRAF2 and TRADD - FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*84, 299 - 308 (1996)) 및 수용체 상호작용 단백질(RIP) (Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. & Goeddel, D.V. TNF - dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor - 1 signaling complex. *Immunity*4, 387 - 396 (1996))과 같은 다른 세포 단백질을 보충한다. FADD는 프로카스파제(procaspase) - 8과 직접 상호작용하여 프로카스파제 - 8의 활성화를 유도한다(Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD - interacting protease, in Fas/APO - 1 - and TNF receptor - induced cell death. *Cell*85, 803 - 815 (1996). Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD - homologous ICE/CED - 3 - like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO - 1) death - inducing signaling complex. *Cell*85, 817 - 827 (1996). Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes - Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E.S. Molecular ordering of the Fas - apoptotic pathway: the Fas/APO - 1 protease Mch5 is a CrmA - inhibitable protease that activates multiple Ced - 3/ICE - like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*93, 14486 - 14491 (1996)). TRAF2와 RIP는 NF- κ B와 Jun(Jun) 키나아제의 활성화로 이끄는 신호 경로를 자극하며, 그 결과 일부 세포 유형에서는 어팍토시스가 억제되는 것으로 나타났다(Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. & Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*87, 565 - 576 (1996). Kelliher, M.A. et al. The death domain kinase RIP mediates the TNF - induced NF- κ B signal. *Immunity*8, 297 - 303 (1998)). NF- κ B의 활성화는 또한 친염증성 반응 및 면역 반응에 관련된 유전자의 유도를 이끈다(Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T. & Baltimore, D. The involvement of NF- κ B in beta - interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*57, 287 - 294 (1989). Libermann, T.A. & Baltimore, D. Activation of interleukin - 6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*10, 2327 - 2334 (1990). Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I. & Baltimore, D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*80, 321 - 330 (1995). Kontgen, F. et al. Mice lacking the c - rel proto - oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin - 2 expression. *Genes Dev.*9, 1965 - 1977 (1995)). 이러한 관찰은 TNF- α 가 어팍토시스 신호 경로와 안티 - 어팍토시스 신호 경로 둘다를 동시에 활성화시킴을 나타낸다. 따라서, 안티 - 어팍토시스 신호 경로가 차단되지 않으면 TNF- α 는 많은 세포 시스템에서 제한된 어팍토시스를 유도한다(Beg, A.A. & Baltimore, D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF - alpha - induced cell death. *Science*274, 782 - 784 (1996). Wang, C.Y., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S.J. TNF - and cancer therapy - induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*274, 784 - 787 (1996). Van Antwerp, D.J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D.R. & Verma, I.M. Suppression of TNF - alpha - induced apoptosis by NF- κ B. *Science*274, 787 - 789 (1996)).

TNF-R1과는 달리, 활성화된 Fas는 어댑터 분자로서 단지 FADD만을 보충한다(Boldin, M.P.et al.A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain.J. Biol. Chem.270, 7795 - 7798 (1995). Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. FADD, a novel death domain - containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.Cell 81, 505 - 512 (1995).Chinnaiyan, A.M.et al.FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO - 1) and tumor necrosis factor receptor - induced apoptosis.J. Biol. Chem.271, 4961 - 4965 (1996). Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J. & Blenis, J. Essential requirement for caspase - 8/FLICE in the initiation of the Fas - induced apoptotic cascade.Curr. Biol.8, 1001 - 1008 (1998)). 그 결과, Fas는 단지 어댑토시스 신호 경로만을 활성화시킨다. 아마도 이것 때문에 FasL이 TNF - α 보다 더 강한 어댑토시스 활성을 가지는 것으로 보인다. 활성화된 카스파제 - 8은 핵 뿐만 아니라 세포 기질, 세포골격 및 핵의 단백질과 DNA의 절단으로 이끄는 카스파제 캐스캐이드를 시작한다. 연구들은 Bcl-2 계 성분 Bid가 카스파제 - 8에 의해 절단됨을 증명한다. 절단된 Bid는 미토콘드리아로부터 사이토크롬 c 방출을 유도하는 것으로 나타났다(Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.Cell94, 481 - 490 (1998). Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.Cell94, 491 - 501 (1998)). 일단 방출되면, 사이토크롬 c는 Apaf - 1에 결합하며 카스파제 - 9 활성화에 참여한다(Li, P.et al.Cytochrome c and dATP - dependent formation of Apaf - 1/caspase - 9 complex initiates an apoptotic protease cascade.Cell91, 479 - 489 (1997). Pan, G., O'Rourke, K. & Dixit, V.M. Caspase - 9, Bcl - XL, and Apaf - 1 form a ternary complex. J. Biol. Chem.273, 5841 - 5845 (1998)). 이어서 활성화된 카스파제 - 9는 카스파제 - 3을 활성화시킬 수 있으며(Li, P.et al.Cytochrome c and dATP - dependent formation of Apaf - 1/caspase - 9 complex initiates an apoptotic protease cascade.Cell91, 479 - 489 (1997)), 카스파제 - 3는 CAD 억제자(ICAD)를 절단함으로써(Enari, M.et al.A caspase - activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.Nature391, 43 - 50 (1998). Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.Nature391, 96 - 99 (1998). Liu, X.et al.The 40 - kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis.Proc. Natl. Acad. Sci. U S A95, 8461 - 8466 (1998)) CAD의 억제자(ICAD/DFF - 45)로부터 CAD(카스파제 - 활성화된 DNase)라고 불리는 DNase를 방출한다. 이 과정은 어댑토시스에서 중요한 사건인 DNA 분해를 일으키게 한다.

어댑토시스를 일으키는 또 하나의 인자인 TRAIL(중양 피사 인자 관련 어댑토시스 - 유도 리간드) 또한 중양 피사 인자(TNF) 계 성분으로서, TNF 계의 다른 성분인 TNF - α 및 FasL처럼, 타입II 횡단막 리간드 분자이다(Wiley, S.R.et al.Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis.Immunity3, 673 - 682 (1995).Pitti, R.M.et al.Induction of apoptosis by Apo - 2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family.J. Biol. Chem.271, 12687 - 12690 (1996)). TRAIL 단백질의 결정 구조에 대한 최근의 연구(Cha, S.S.et al.2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity.Immunity11, 253 - 261 (1999). Hymowitz, S.G.et al.Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5.Mol. Cell4, 563 - 571 (1999))는 그 횡단막 영역에서 절단된 가용성 TRAIL 단백질이 호모트라이머(homotrimer)를 형성함을 밝혔으며, 트라이머화는 재조합 TRAIL(rTRAIL)이 어댑토시스 능력을 얻는 데 필요한 과정으로 나타났다(Hymowitz, S.G.et al.A unique zinc - binding site revealed by a high - resolution X - ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL.Biochemistry39, 633 - 640 (2000)).

TRAIL의 생리학적 및 치료학적 중요성에도 불구하고, TRAIL의 사멸 신호전달 체계에 대해서는 별로 알려져 있지 않다. 최근의 연구 결과는 TRAIL 수용체를 통해 매개된 신호가 Fas - 매개된 신호와 유사함을 지적하면서 TRAIL - 유도 어댑토시스에서 카스파제 - 8의 핵심적인 역할을 제안한다(Seol, D.W., Li, J., Seol, M.H., Talanian, R.V. & Billiar, T.R. Signaling events triggered by tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL): caspase - 8 is required for TRAIL - induced apoptosis.manuscript submitted).

지금까지, TRAIL 수용체로는 DR4/TRAIL - R1 (Pan, G.et al.The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.Science276, 111 - 113 (1997)), DR5/TRAIL - R2(Pan, G.et al.An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL.Science277, 815 - 818 (1997). Sheridan, J.P.et al.Control of TRAIL - induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.Science277, 818 - 821 (1997).MacFarlane, M.et al.Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL.J. Biol. Chem.272, 25417 - 25420 (1997)) 및 두 가지의 미끼(decoy) 수용체(DcR1과 DcR2) (Pan, G.et al.An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL.Science277, 815 - 818 (1997). Sheridan, J.P.et al.Control of TRAIL - induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.Science277, 818 - 821 (1997). MacFarlane, M.et al.Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL.J. Biol. Chem.272, 25417 - 25420 (1997). Marsters, S.A.et al.A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain.Curr. Biol.7, 1003 - 1006 (1997))를 포함한 네 가지가 확인되었다. DR4와 DR5는 완전한 기능성 TRAIL 수용체로서, TRAIL이 어팍토시스를 유도하는 활성이 이들을 통해 세포질로 전달된다. DcR1과 DcR2는 절단된 TRAIL 수용체로서 사멸 도메인을 함유하는 세포질 영역이 결실된다. 따라서, DcR1과 DcR2의 과다 발현은 아마도 TRAIL에 대해 DR4 또는 DR5와 경쟁함으로써 DR4와 DR5의 기능을 차단하는 것으로 보인다(Pan, G.et al.An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL.Science277, 815 - 818 (1997)).

Sheridan, J.P.et al.Control of TRAIL - induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.Science277, 818 - 821 (1997). MacFarlane, M.et al.Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL.J. Biol. Chem.272, 25417 - 25420 (1997).Marsters, S.A.et al.A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain.Curr. Biol.7, 1003 - 1006 (1997)).

TRAIL은 TNF계 성분임에도 불구하고, TNF- α 및 FasL과 몇 가지 주목할 만한 차이를 갖는다. 첫째, 그 발현이 일부 조직에만 한정되는 Fas와는 달리, TRAIL 수용체는 널리 발현되어(Pan, G.et al.The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.Science276, 111 - 113 (1997).Pan, G.et al.An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL.Science277, 815 - 818 (1997). Sheridan, J.P.et al.Control of TRAIL - induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.Science277, 818 - 821 (1997). MacFarlane, M.et al.Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL.J. Biol. Chem.272, 25417 - 25420 (1997)) 대부분의 조직 및 세포 유형이 TRAIL의 표적이 될 수 있다. 둘째, TRAIL은 생체 내에서 정상 세포가 아닌 종양 세포에서만 어팍토시스를 야기하는 독특한 선택성을 갖는다. 따라서, 전신성 전달(systemic delivery)에서 급성 대량 간 손상을 유도하는 FasL 또는 투쟁적인 Fas 항체(Ogasawara, J.et al.Lethal effect of the anti - Fas antibody in mice.Nature364, 806 - 809 (1993). Galle, P.R.et al.Involvement of the CD95 (APO - 1/Fas) receptor and ligand in liver damage.J. Exp. Med.182, 1223 - 1230 (1995))와는 대조적으로, TRAIL은 마우스(Walczak, H.et al.Tumoricidal activity of tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand in vivo.Nat. Med.5, 157 - 163 (1999))와 원숭이(Ashkenazi, A.et al.Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand.J. Clin. Invest.104, 155 - 162 (1999))에서 검출가능한 세포독성을 나타내지 않았다. 셋째, HIV - 1 바이러스에 감염된 T 세포는 감염되지 않은 T 세포보다 TRAIL에 의해 더욱 잘 사멸되는 것으로 나타났다(Jeremias, I., Herr, I., Boehler, T. & Debatin, K.M. TRAIL/Apo - 2 - ligand - induced apoptosis in human T cells.Eur. J. Immunol.28, 143 - 152 (1998)). 넷째, TRAIL에 의해 유도되는 어팍토시스는 화학 암 치료제 또는 방사선을 이용하는 암 치료에서 중요한 인자로 간주되는 정상 p53에 의존하지 않는다(Seol, D.W., Seol, M.H. & Billiar, T.R. Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis independent of p53 status.manuscript in preparation.). 이러한 특징들은 재조합 TRAIL (rTRAIL) 단백질이 사암의 암 및 AIDS의 치료제로서 상당히 전망 있음을 보여준다.

하지만, 항암제로 rTRAIL 단백질을 이용하는 데는 몇 가지 극복되어야 할 기술적 문제가 있다. 첫째, 고 품질의 rTRAIL을 충분한 양으로 생산하는 것은 실질적으로 매우 어려우며, 심지어 미생물 세포로부터의 생산 수율도 만족스럽지 못하다. 둘째, 충분한 양의 rTRAIL이 개선된 정제 방법에 의해 미생물로부터 정제될 수 있다 할지라도, 미생물내 독소를 포함한 오염물질의 제거가 또 하나의 문제점이다. 셋째, 미생물에 의해 생성된 rTRAIL이 모든 생물학적 특성에 있어 포유류 세포에 의해 생성된 단백질과 동일한 지가 입증되지 않았다. 따라서, rTRAIL을 생산하기 위한 보다 안전하고

민을만한 방법은 형질 감염된 포유류 세포로부터 rTRAIL을 수득하는 것이다. 하지만, 이 방법은 비용이 많이 드는 문제점 때문에 이 방법에 의해 rTRAIL이 생산되어 치료제로 쓰일 경우, 결국 환자에게 고비용의 부담이 전가될 것이다. 넷째, rTRAIL을 이용한 단백질 치료요법은 현재 일반적으로 사용되는 모든 항암제처럼 정기적으로 환자가 병원을 방문해 치료종결 시까지 지속적으로 투여받아야 하는 방식이 될 것이다. 이것 역시 고비용의 부담을 안고 있다.

AAV(adeno - associated virus)는 엔벨로프를 가지지 않으며, 천연적으로 결함을 가진 비병원성인 파보바이러스(parvovirus)이다(Berns, K.I. & Adler, S. Separation of two types of adeno - associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J. Virol.*9, 394 - 396 (1972). Berns, K.I. & Rose, J.A. Evidence for a single - stranded adenovirus - associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. *J. Virol.*5, 693 - 699 (1970)). AAV 복제 사이클은 잠재적 단계 및 생산 단계의 두 가지 단계로 구성된다. 아데노 바이러스와 같은 보조 바이러스의 존재하에(Berns, K. Parvoviridae and their replication, in: Fields, B.N., Knipe, D.M. (Eds), *Virology*, 2nd edition. Vol. 2. Raven Press, New York, pp. 1743 - 1764. (1990). Muzyczka, N. Use of adeno - associated virus as a general transduction vector. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*158, 97 - 129 (1992). Berns, K.I. & Giraud, C. Biology of the adeno - associated virus, in: Berns, K.I., Giraud, C. (Eds.), *Adeno - associated virus (AAV) vectors in gene therapy*. Vol. 218. Springer, Berlin, pp. 1 - 24. (1996)).

AAV는 후대 비리온을 생성하면서 복제한다. 보조 바이러스가 없는 상태에서는, AAV는 19번 염색체상의 해를 일으키지 않는 특정 부위내로 삽입되어, 보조 바이러스가 잠재 상태에서부터 AAV 바이러스를 구조할 때까지 남아있게 된다(Kotin, R.M. et al. Site - specific integration by adeno - associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*87, 2211 - 2215 (1990)).

AAV게놈은 선형의 단일쇄 DNA이며, 각 말단에 145 개의 염기로 구성된 말단 반복(TR) 서열을 함유한다(Srivastava, A., Lusby, E.W. & Berns, K.I. Nucleotide sequence and organization of the adeno - associated virus 2 genome. *J. Virol.*45, 555 - 564 (1983)).

TR 서열은 DNA 복제의 기원으로 작용하며, 재조합 AAV(rAAV) 게놈이 감염성 비리온으로 패키징되는 데 요구되는 유일한 알려진 시스 - 작용성 요소이다. TR 요소는 두 개의 오픈 리딩 프레임(ORF)의 양 측면에 위치한다. 좌측의 ORF(즉 rep 유전자)는 바이러스 DNA 복제 및 조립에 필수적인 Rep78, 68, 52 및 40으로 불리는 네 개의 구조 단백질을 암호한다. 우측의 ORF(즉 cap 유전자)는 세 개의 구조 단백질 VP1, VP2, 및 VP3을 암호한다(Berns, K. Parvoviridae and their replication, in: Fields, B.N., Knipe, D.M. (Eds), *Virology*, 2nd edition. Vol. 2. Raven Press, New York, pp. 1743 - 1764. (1990). Muzyczka, N. Use of adeno - associated virus as a general transduction vector. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*158, 97 - 129 (1992). Berns, K.I. & Giraud, C. Biology of the adeno - associated virus, in: Berns, K.I., Giraud, C. (Eds.), *Adeno - associated virus (AAV) vectors in gene therapy*. Vol. 218. Springer, Berlin, pp. 1 - 24. (1996)).

rAAV 벡터 구성은 일반적으로 rep 유전자와 cap 유전자를 제거하고 TR 요소 사이에 관심의 대상인 트랜스유전자를 삽입하는 것에 관련된다. 이어서 생성된 그 벡터 플라스미드를 AAV rep 유전자 및 cap 유전자를 발현하는 패키징 플라스미드와 함께 조직 배양 세포에 동시 형질감염시킨다(Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. Production of high - titer recombinant adeno - associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.*72, 2224 - 2232 (1998)). 효율적인 AAV 복제를 위한 보조 바이러스 기능은 아데노 바이러스(Samulski, R.J., Chang, L.S. & Shenk, T. Helper - free stocks of recombinant adeno - associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.*63, 3822 - 3828 (1989)) 또는 아데노 바이러스의 보조 기능 유전자를 발현하는 보조 플라스미드에 의해 제공될 수 있다(Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. Production of high - titer recombinant adeno - associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.*72, 2224 - 2232 (1998). Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum. Gene Ther.*9, 2745 - 2760 (1998)). 이런 보조 기능 유전자의 도움으로 배양세포로부터 재조합 DNA가 패키징된 AAV 입자를 대량으로 생산할 수 있다.

AAV가 부위 특이적으로 삽입되는 능력, 천연의 결합성 및 병원성의 결여는 유전자 치료 벡터로서의 이용을 가능하게 하며, AAV가 게놈에 삽입되는 능력은 또한 거의 영구적인 표적 유전자 발현을 가능하게 한다. 재조합 AAV(rAAV) 벡터는 배양 세포뿐만 아니라 폐(Flotte, T.R.et al.Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno - associated virus vector.Proc. Natl. Acad. Sci. U S A90, 10613 - 10617 (1993).Conrad, C.K.et al.Safety of single - dose administration of an adeno - associated virus (AAV) - CFTR vector in the primate lung.Gene Ther.3, 658 - 668 (1996). Halbert, C.L.et al.Transduction by adeno - associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration.J. Virol.71, 5932 - 5941 (1997)), 뇌(Kaplitt, M.G.et al.Long - term gene expression and phenotypic correction using adeno - associated virus vectors in the mammalian brain.Nat. Genet.8, 148 - 154 (1994)), 근육(Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J. Efficient long - term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno - associated virus vector.J. Virol.70, 8098 - 8108 (1996). Rivera, V.M.et al.Long - term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer.Proc. Natl. Acad. Sci. U S A96, 8657 - 8662 (1999)), 망막(Flannery, J.G.et al.Efficient photoreceptor - targeted gene expression in vivo by recombinant adeno - associated virus.Proc. Natl. Acad. Sci. U S A94, 6916 - 6921 (1997)), 중추 신경계(Peel, A.L., Zolotukhin, S., Schrimsher, G.W., Muzyczka, N. & Reier, P.J. Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno - associated virus vectors containing cell type - specific promoters.Gene Ther.4, 16 - 24 (1997)) 및 간(Xiao, W.et al.Adeno - associated virus as a vector for liver - directed gene therapy.J. Virol.72, 10222 - 10226 (1998))과 같은 생체내의 다양한 다른 조직들을 형질 도입시킨다.

상기한 바와 같이, TRAIL이 효과적인 암 치료제로서 주목받고 있으나 그 이용성 면에서 여러 가지 문제점들을 가지고 있었던 바, 본 발명자들은 이러한 문제점들을 극복하기 위해, 신규의 분비 가능한 트라이머형 rTRAIL 생성을 위한 DNA 카세트, 구성형 발현 벡터, 유전자 치료에 적합한 AAV계 벡터 시스템, 및 이들을 이용한 유전자 치료법 등을 개발하게 되었다.

본 발명의 분비가능한 트라이머형 rTRAIL 생성을 위한 DNA 카세트를 포함하는 AAVdw벡터를 장착한 AAV 입자를 이용한 유전자 치료법은 고품질의 치료용 rTRAIL 단백질이 환자의 체내에서 직접 생성되도록 한다. AAV 입자를 이용한 본 발명의 기술은 또한 AAV의 특성상 환자에 대한 단 한 번의 주사만으로 rTRAIL이 거의 영구적으로 체내에서 생산될 수 있도록 한다. 뿐만 아니라, 본 발명은 Tet - On 유도성 시스템을 이용함으로써 고품질의 rTRAIL이 저렴한 테트라사이클린이나 독시사이클린에 의해 조절적 방식으로 거의 영구적으로 환자의 체내에서 발현되도록 한다. 따라서, 본 발명이 실시되어 치료제로 사용될 경우, 본 발명에 의한 항암치료는 환자가 부담하는 비용 면에서 뿐 아니라 용이성 면에서도 기존의 항암제 보다 월등히 나을 것으로 여겨진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 합성 후 배양 배지로, 또는 체내 순환계로 분비될 수 있으며, 호모 트라이머 형성 기능이 크게 향상된 재조합 TRAIL(아미노산 114 - 281) 단백질을 암호하는 DNA 카세트의 제공을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 재조합 TRAIL 단백질의 분비를 위한 분비 시그널 서열(SS), 트라이머 형성 촉진을 위한 트라이머 형성 도메인(TFD) 및 TRAIL(114 - 281) 암호 cDNA로 구성된 DNA 카세트의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 상기의 DNA 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 그 재조합 발현 벡터로 형질전환된 세포주의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 상기의 형질 전환 세포주로부터 수득된 재조합 TRAIL(114 - 281) 단백질의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 삽입된 외래 유전자를 구성형으로 발현시킬 수 있는 pCMVdw 벡터의 제공을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 분비성 트라이머 TRAIL 단백질을 구성형으로 발현할 수 있는 재조합 벡터 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)과 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114-281) 또는 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281)을 포함하는 암, AIDS 등의 치료용 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 삽입된 외래 유전자를 유도성으로 발현시킬 수 있는 아데노 관련 바이러스(AAV) 계 벡터의 제공을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 테트라사이클린/독시사이클린에 의한 유도 반응으로 피드 포워드 증폭 루프(feed-forward amplification loop) 방식에 의해 외래 유전자를 최대로 발현할 수 있는 Tet-On 시스템의 아데노 관련 바이러스 계 벡터 pAAVdw를 제공한다.

본 발명은 본 발명의 TRAIL DNA 카세트를 포함하여 Tet-On 유도성 형식으로 재조합 트라이머형 TRAIL을 발현하기 위해 이용될 수 있는 재조합 발현 벡터 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114-281) 또는 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281) 벡터의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 pAAVdw 벡터를 포함하는 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114-281) 또는 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281) 벡터를 포함하는 암, AIDS 등의 치료용 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 pAAVdw 벡터가 패키징 된 바이러스 입자 및 이를 포함하는 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114-281) 또는 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281) 벡터가 패키징된 바이러스 입자 및 이를 포함하는 암, AIDS 등의 치료용 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

본 발명은 본 발명 DNA 카세트에 의해 생성되는 재조합 TRAIL 단백질과 액티노마이신 D(ActD)를 포함하는 암, AIDS 등의 조합 치료에 이용될 수 있는 약학 조성물의 제공을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 분비가능한 트라이머 rTRAIL의 생성을 위한 TRAIL DNA 카세트의 구성, pCMVdw 벡터, 및 AAV 입자에 패키징 될 수 있는 피드-포워드 증폭 루프 방식의 Tet-On 시스템을 장착한 pAAVdw 벡터의 개발, TRAIL DNA 카세트와 이들 두 벡터의 조합에 의한 재조합 벡터 제조, 및 이들 벡터를 이용한 암 등의 치료를 포함한다.

본 발명은 분비 시그널 서열(SS), 트라이머 형성 도메인(TFD) 및 TRAIL(114-281) 암호 cDNA로 구성되는 TRAIL DNA 카세트를 하나의 특징으로 한다.

세포내에서 생성된 단백질이 세포외로 분비되기 위해서는 분비 시그널 서열을 필요로 하므로, rTRAIL이 순환계(배양 세포의 경우는 배양물의 배양배지)로 분비되도록 할 수 있는 적절한 분비 시그널(SS) 서열을 동정하였다.

rTRAIL 단백질이 세포외로 분비될 수 있으면 체내에서 세포로부터 생성된 rTRAIL이 순환계로 분비될 수 있다. 이 경우 TRAIL 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 소위 유전자 치료법을 이용하여 rTRAIL 단백질을 대신할 치료제로서 환자에 직접 투여하는 것이 가능하게 된다. 또한, rTRAIL이 세포외로 분비될 수 있으면, 분리 정제된 rTRAIL을 치료제로 직접 사용한다하더라도 그 분리와 정제가 훨씬 용이하다. 즉, 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포의 세포질로부터가 아니라 그 세포의 세포 배양 배지로부터 rTRAIL을 생산할 수 있다. 따라서 분비성 rTRAIL은 분리 정제를 위해 세포 파괴 과정을 거치지 않으므로, 세포 파편들에 의한 오염 문제없이 순도 높은 rTRAIL 생산이 가능하다.

이에 본 발명자들은 재조합 벡터에 의해 생성되는 rTRAIL이 바로 순환계 또는 배양 배지로 분비될 수 있도록 분비 시그널 서열을 카세트에 포함시켰다.

본 발명에서 분비 시그널 서열을 rTRAIL에 융합시킨 것은 단순한 분비성 단백질 생산의 차원을 넘어 본 발명이 이론 기술의 핵심적 사항 중 하나이다. 그 이유는, 기존의 rTRAIL을 이용한 연구 및 치료제 개발은 rTRAIL 단백질을 분리 정제하여 이용하는 것이었던 데 반해, 본 발명은 분비 시그널 서열을 TRAIL 서열에 융합시킴으로써 그 유전자 서열을 이용한 유전자 치료법의 구성을 가능케 하였기 때문이다. 즉, 본 발명은 분비 시그널을 사용함으로써 rTRAIL의 치료제 개발 관점을 단백질 치료제 개발에서 유전자 치료법을 이용한 치료제 개발로의 이행을 가능케 한 것이라고 볼 수 있다.

본 발명에서 이용된 분비 시그널 서열은 SEC2 시그널 서열(도 1a)과 SEC(CV) 시그널 서열(도 1b)로서, 전자는 사람 피브리노겐-1(Ritty, T.M., Broekelmann, T., Tisdale, C., Milewicz, D.M. & Mecham, R.P. Processing of the fibrinogen-1 carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 274, 8933-8940 (1999))으로부터 후자는 사람 성장 호르몬(Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. & Goodman, H.M. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205, 602-607 (1979))으로부터 유래된 것이다.

상기 두 가지 시그널 서열의 임의의 분비 시그널 서열이 이용될 수 있으며, 이들을 DNA 카세트에 포함시키는 것을 용이하게 하기 위하여 각 분비 시그널 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 제한 효소 부위를 포함하는 뉴클레오타이드들을 부가할 수 있다.

한편, 분비 시그널 서열의 절단 및 치료제로 사용되었을 때 면역반응의 최소화를 목적으로 SEC(CV)의 카르복시 말단에는 퓨린(Furin) - 특이적 절단 서열(Denault, J.B. & Leduc, R. Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett.* 379, 113-116 (1996))을 부가하였다. 퓨린은 가장 잘 규명된 포유류 서브틸리진 계 프로테아제로서 그 인지 서열의 특이적 부위를 절단하는 것으로 알려져 있다. 절단 부위는 도 2의 화살표 부위이다. 다른 퓨린 - 특이적 절단 서열(Denault, J.B. & Leduc, R. Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett.* 379, 113-116 (1996). Groskreutz, D.J., Sliwkowski, M.X. & Gorman, C.M. Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J. Biol. Chem.* 269, 6241-6245 (1994))이 이용될 수 있으며, 제한 효소 부위를 포함하는 뉴클레오타이드들이 퓨린 - 특이적 절단 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 부가될 수 있다. 또한, SEC(CV)의 분비 시그널 서열 부분과 퓨린 - 특이적 절단 서열 사이에, 제한 효소 부위를 포함하는 뉴클레오타이드들이 부가될 수 있다.

다른 프로테아제 - 특이적 절단 부위가 분비 시그널 서열에 부가될 수도 있다.

카세트의 두 번째 성분으로서, rTRAIL 단백질의 트라이머화를 촉진시킬 수 있는 인공적인 트라이머 형성 도메인을 카세트에 포함시키기 위해, SS 서열을 돌연변이 루이신 지퍼(leucine zipper, LZ)와 같은 인공의 트라이머 - 형성 도메인(TFD)에 융합시켰다. rTRAIL이 어파트시스 유도 활성을 갖기 위해서는 트라이머를 형성해야 하는 바, 가용성 rTRAIL이 트라이머를 형성하긴 하지만, 인공의 트라이머 - 형성 도메인이 가용성 rTRAIL에 융합될 때 트라이머화가 크게 증가되는 것으로 밝혀졌다(Walczak, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5, 157-163 (1999)).

본 발명에 이용된 트라이머 형성 도메인은 GCN4의 LZ 변이체인 이소루이신 지퍼(ILZ) (Harbury, P.B., Kim, P.S. & Alber, T. Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. *Nature* 371, 80-83 (1994))로서 그 아미노산 서열 및 핵산 서열이 도 3에 나타나 있다.

ILZ는 호모 트라이머를 형성하며, 단백질에 융합되면 그 단백질의 트라이머화를 촉진한다.

도 3에 나타난 서열의 변이체로서, 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 삽입, 치환 등에 의해 그 서열이 도 3의 ILZ 서열과 상이하더라도 도 3의 아미노산 서열에 대하여 적어도 80% 이상의 서열 상동성을 유지하며 트라이머 형성 도메인으로서 그 활성을 갖는다면 그 변이체 역시 ILZ 서열로 간주되며 본 발명의 카세트에 이용될 수 있다.

ILZ 암호 서열의 5' 말단과 3' 말단에는 제한 효소 부위를 포함하는 뉴클레오타이드들이 포함될 수 있다.

ILZ 외에도 트라이머를 형성할 수 있는 LZ (trimeric LZ) (Walczak, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand in vivo. Nat. Med. 5, 157 - 163 (1999)) 및 콜라겐 타입 X의 NC 1 도메인 (Zhang, Y. & Chen, Q. The noncollagenous domain 1 of type X collagen. A novel motif for trimer and higher order multimer formation without a triple helix. J. Biol. Chem. 274, 22409 - 22413 (1999)) 과 같은 트라이머 형성 도메인도 본 발명에 이용될 수 있다.

상기와 같이 구성된 "SS - TFD" 를 사람의 TRAIL(아미노산 114 - 281) cDNA에 융합시켜 "SS - TFD - TRAIL(아미노산 114 - 281) cDNA" 카세트를 구성하였다.

rTRAIL 단백질을 위한 암호 서열로서는, HeLa, MCF - 7 및 Jurkat를 포함하는 많은 표적 세포에서 어팍토시스를 유도하는 것으로 알려진 아미노산 114 - 281의 TRAIL을 위한 서열 (Pitti, R.M. et al. Induction of apoptosis by Apo - 2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J. Biol. Chem. 271, 12687 - 12690 (1996)) 을 이용하였다.

서브클로닝을 촉진하는 적절한 제한 부위를 각 말단에 함유한 프라이머 세트를 이용한 PCR에 의해 사람 TRAIL(114 - 281) cDNA를 얻었다. 그 서열이 도4에 나타나 있다.

점 돌연변이, 결실 또는 삽입과 같은 조작에 의해 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열이 일부 변형되더라도 그 아미노산 서열이 도4의 서열과 적어도 80% 이상의 서열 상동성을 가지며 그로부터 얻어진 단백질이 도4 서열의 TRAIL과 동일한 생물학적 기능을 갖는다면 그러한 변형된 서열 역시 사람 TRAIL 서열로서 본 발명에 이용될 수 있다.

또한, 글리코실화를 포함한 임의의 해독 후 변형이 TRAIL(114 - 281) 단백질의 생물학적 활성에 크게 영향을 주지 않는다면, 그러한 변형된 서열 역시 본 발명에 이용될 수 있다.

사람 TRAIL(114 - 281) 암호 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 제한 효소 부위를 포함하는 뉴클레오티드들이 부가될 수 있다.

이와 같이 구성된 "SS - TFD - TRAIL cDNA(114 - 281)" 카세트를 함유한 재조합 발현 벡터로 형질감염된 세포는 표적 세포를 사멸시키는 능력이 매우 강력한 분비성 재조합 트라이머 TRAIL(srtTRAIL)을 생산하였다.

이와 같이 구성된 본 발명의 TRAIL 카세트는 적절한 발현 벡터에 클로닝되어 분비성 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질의 대량 생산에 이용되거나 유전자 치료를 위하여 직접 환자의 체내로 투여될 수 있다.

본 발명은 상기와 같은 TRAIL 카세트 등의 외래 유전자의 발현을 위해 이용될 수 있는 포유류 발현 벡터인 pCMVdw와 pAAVdw를 하나의 특징으로 한다.

pCMVdw 벡터는 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터에 의해 유도되는 포유류 발현 벡터로서, pCR3 벡터(Invitrogen에서 구입)의 다중 클로닝 부위(HindIII부터 ApaI까지)를 도 5의 서열로 치환시켜 제조하였다.

pCR3 벡터는 포유류 세포에서의 발현을 위해 가장 광범위하게 이용되는 pcDNA 계열(Invitrogen)의 벡터로서, 사이토메갈로 바이러스(CMV)의 초기 프로모터(pCMV)를 장착하고 있는 플라스미드이다. pCMV는 현재 알려져 있는 프로모터들 중에서 가장 강력한 프로모터이며 일시적 발현에서 뿐만 아니라 안정한 발현에서도 강력한 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 이 벡터는 T7 및 Sp6 프로모터 영역도 가지고 있어서 T7이나 Sp6 폴리머라제를 이용한 시험관내 전사, 해독을 가능하게 한다. 또한, 이 벡터는 카피수가 높은 플라스미드로서 벡터 제조를 용이하게 하는 장점을 가지고 있으며, 네오마이신 내성 유전자를 암호화하고 있어 형질 감염을 통해 안정한 세포주 구축이나 외래 유전자의 안정한 발현도 가능케 한다.

그러나, pCR3 벡터의 다중 클로닝 부위(MCS)에는 여러 종류의 제한 효소 부위가 있지만 산만하며 독특한 부위들이 적어 그 이용성이 떨어지는 바, 이를 개선하기 위하여 다중 클로닝 부위를 흔히 이용되는 제한 효소 부위들을 함유하도록 구성된 도 5b의 서열로 치환시킴으로써 서브클로닝에 유용한 pCMVdw 벡터를 제조하였다. 이처럼, pCR3의 기본적인 장점을 그대로 가지면서 유용한 클로닝 부위들을 가진 pCMVdw 벡터는 포유류 세포주에서의 TRAIL의 대량 생산을 위해 유용할 뿐만 아니라, 임의의 외래 유전자의 구성형 발현을 위해 이용될 수 있다.

단지 분비 신호만이 pCMVdw 벡터내에 들어가 있는 pCMVdwSEC2와 pCMVdwSEC(CV) 벡터는 생물학적 활성을 위하여 분비를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있으며, 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 그 유전자를 발현시키기 위하여, 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다.

ILZ 서열이 pCMVdw 벡터내로 혼입된 pCMVdwILZ는 그 생물학적 활성을 위하여 트라이머화를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있으며, 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 그 유전자를 발현시키기 위하여, 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다.

분비 신호와 ILZ 서열이 pCMVdw 벡터내로 혼입된 pCMVdwSEC2ILZ와 pCMVdwSEC(CV)ILZ 벡터는 그 생물학적 활성을 위하여 분비와 트라이머화를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있으며, 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 그 유전자를 발현시키기 위하여 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다.

한편, 유도성 발현 벡터인 pAAVdw 벡터는 제조할 AAV 입자에 패키징되는 AAV 게놈 플라스미드(pXX - UF1, Dr.X. Xiao, University of Pittsburgh로부터 입수함)의 구성형 활성인 CMV와 TK 프로모터를 본 발명자에 의해 구성된 신규의 Tet - On 유도성 프로모터(표적 유전자 발현이 테트라사이클린 또는 그 유도체인 독시사이클린에 의해 개시됨)로 치환시켜 제조하였다.

일반적으로 표적 유전자는 크게 두가지 방식, 즉 구성형 또는 유도성 방식에 의해 발현된다.

유도성 방식에 의해 표적 유전자가 발현되는 경우는 주로 발현될 표적 유전자가 게놈 상에 삽입되는 안정한 발현에 의한다. 표적 유전자를 유도성 방식으로 발현시키기 위한 시스템은 예를 들어, 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템(Baron, U., Gossen, M. & Bujard, H. Tetracycline - controlled transcription in eukaryotes: novel trans activators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 25, 2723 - 2729 (1997)), 엑디손 - 유도성 시스템(No, D., Yao, T.P. & Evans, R.M. Ecdysone - inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 3346 - 3351 (1996)), 라파마이신 - 유도성 시스템(Rivera, V.M. et al. Long - term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 8657 - 8662 (1999)) 등이 현재 알려져 있다. 이들 중에서 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템이 생체내에서 가장 광범위하게 사용되고 있으며 우려할만한 부작용도 없다. 테트라사이클린과 독시사이클린은 경구투여가 가능한 매우 저렴한 물질이므로 경제적 관점에서도 다른 것에 비해 뛰어나다.

테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템은 크게 두 부분으로 구성되어 있다.

첫 번째 부분은 tTA 또는 rtTA를 발현시키는 부분으로써, 발현된 tTA나 rtTA는 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합하게 된다. 현재까지 개발된 tTA 또는 rtTA 발현 프로모터는 대부분 모두 완전한 기능을 갖춘 CMV 프로모터이다. 따라서 tTA 또는 rtTA는 CMV 프로모터의 기능이 허용하는 범위내에서 최대로 항상 발현된다.

두 번째 부분은 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합한 tTA 또는 rtTA에 의해 조절될 표적 유전자를 암호하는 부분이다. 표적 유전자의 발현은 완전한 기능을 갖춘 CMV 프로모터 대신 최소 CMV 프로모터와 이 최소 프로모터의 기능을 조절하는 인핸서(enhancer)의 융합체에 의해 이루어진다. 인핸서의 기능은 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합한 tTA 또는 rtTA의 결합체에 의해 조절된다. 기본적으로 표적 유전자 발현은 최소 CMV 프로모터에 의해 이루어지므로 인핸서 기능의 개입이 없을 경우 표적 유전자의 기본 발현 농도는 최소 CMV 프로모터가 허용하는 범위 내

에서 이루어진다.

테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템의 채택에 있어 첫 번째 부분의 주요 구성요소인 TA(tTA 또는 rtTA)의 종류에 따라 이 시스템은 Tet - On과 Tet - Off로 나뉘질 수 있다.

첫째는 tTA를 선택하는 경우이다. tTA는 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합하지 않은 상태로만 인헨서에 작용하여 인헨싱 기능을 할 수 있다. 그러나 tTA가 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합체를 형성하면 이 결합체는 인헨서에 작용하는 기능을 상실함으로써 더 이상 인헨싱 기능을 행사할 수 없다. 따라서, 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템에서 tTA를 포함하는 경우는 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재하에서 표적 유전자의 발현을 중지시키는 소위 Tet - Off 시스템이 구성된다. 이 시스템을 채택하면 표적 유전자의 생리활성 자체가 치료제로 사용될 경우, 치료가 끝났음에도 불구하고 표적 유전자가 계속 발현됨으로써 더 이상의 표적 유전자 발현이 필요하지 않은 전 기간에 걸쳐 환자가 테트라사이클린이나 독시사이클린을 복용해야 하는 불리함이 있다.

둘째는 rtTA를 선택하는 경우이다. rtTA는 tTA와 정반대로 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합한 상태로만 인헨서에 작용하여 인헨싱 기능을 할 수 있다. 그러나 rtTA는 테트라사이클린 또는 독시사이클린과 결합체를 형성하지 못하면 인헨서에 작용하는 기능을 상실함으로써 더 이상 인헨싱 기능을 행사할 수 없다. 따라서, 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 시스템에서 rtTA를 포함하는 경우는 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재하에서만 표적 유전자를 발현시키는 소위 Tet - On 시스템이 구성된다. 이 시스템을 채택하면 표적 유전자의 생리활성 자체가 치료제로 사용될 경우, 치료는 오로지 테트라사이클린이나 독시사이클린의 복용에 의해서만 개시된다. 치료가 종결되는 경우, 환자는 테트라사이클린이나 독시사이클린의 복용을 중지함으로써 표적 유전자의 발현을 중지시킬 수 있어 Tet - On 시스템이 Tet - Off 시스템보다 훨씬 유리하다고 할 수 있다.

이러한 Tet - On 시스템의 장점때문에 본 발명에서는 Tet - On 시스템을 채택하였으나, 본 발명자는 기존의 Tet - On 시스템과 비교할 때, 작동에 있어 주목할 만한 잇점을 제공할 수 있도록 신규한 본 발명의 Tet - On 시스템을 구성하였다.

먼저, 기존의 Tet - On 시스템에서는 rtTA를 발현시키는 프로모터가 전체 길이 CMV 프로모터인 이유로 rtTA 발현이 항상 강력하게 이루어지나, 본 발명은 전체 길이 CMV 프로모터 대신 최소 CMV 프로모터를 사용함으로써 일단 그 기본 발현 정도를 최소로 하였다. 그러나 본 발명에서 사용된 최소 프로모터는 rtTA와 테트라사이클린 또는 독시사이클린 결합체에 의해 조절되는 인헨서와 결합됨으로써 해서 일단 발현이 될 경우 보다 강력한 발현을 이룰 수 있도록, 소위 피드 - 포워드 증폭 루프(feed - forward amplification loop)를 형성하도록 고안되었다. 즉, 최소로 발현되는 rtTA가 테트라사이클린 또는 독시사이클린이 존재하면 이들과 결합체를 형성하게 되고 이 결합체가 인헨서에 결합함으로써 최소 CMV 프로모터 기능을 현저히 증가시키게 되는 방식이다. 이 때 증가된 프로모터의 기능은 전체 길이 CMV 프로모터 활성과 비교할 때 약 5배 정도에 이른다. Tet - On 시스템에서는 표적 유전자 발현이 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재하에서 rtTA 발현 정도에 직접적으로 비례하므로 본 발명의 Tet - On 시스템이 궁극적인 발현의 강도에서 기존의 Tet - On 시스템보다 현저히 우수하다고 볼 수 있다. 따라서 pAAVdw 벡터는 rtTA가 피드 - 포워드 증폭 루프에 의해 발현되도록 함으로써 표적 유전자의 가능 최대 발현이 이루어지도록 하였다. 즉, 유도 인자인 테트라사이클린 또는 독시사이클린이 존재하게 되면 표적 유전자 발현이 시간의 경과에 따라 계속적인 증폭의 형태로 실현됨으로써 표적 유전자의 발현이 가능 최대치에 이르게 된다.

또한, 항상 강력히 rtTA를 발현시키는 기존의 Tet - On 시스템과는 달리 본 발명의 Tet - On 시스템의 rtTA 발현은 조절적임에 주목할 필요가 있다. 기존의 Tet - On 시스템이 치료제의 한 부분으로 사용될 경우, rtTA의 강력한 상시 발현

이 체내에서 rtTA에 대한 면역반응을 일으킬 가능성을 배제할 수 없다. 그러나, rtTA가 조절적으로 발현이 되는 본 발명의 Tet-On 시스템은 비록 rtTA가 불가피하게 체내에서 면역반응을 일으킨다 하더라도 그 반응 정도를 최소화할 수 있는 장점이 있다.

이처럼, 본 발명의 pAAVdw 벡터의 Tet-On 시스템에 의해 표적 유전자가 발현될 경우, 경구 투여가 가능한 값싼 항생제인 테트라사이클린 또는 독시사이클린을 이용하여 경제적이고 안전하게 강력한 표적 유전자 발현을 유도할 수 있다.

녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein)을 암호하는 유전자인 gfp를 표적 유전자로 함유하는 pAAVdwGFP 벡터를 이용한 일시적인 형질 감염 실험에서, 표적 유전자 gfp의 발현은 테트라사이클린에 대한 반응으로 매우 유도성인 것으로 확인되었다.

pAAVdwGFP에서 gfp 유전자를 분비성 트라이머형 TRAIL을 암호하는 본 발명의 TRAIL DNA 카세트에 치환시킨 pAAVdwSEC2ILZTRAIL 또는 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL을 배양 세포에 일시적 형질 감염시킨 결과, 테트라사이클린에 대한 반응으로 트라이머 rTRAIL이 생성, 분비되었으며, 암세포에 대한 강력한 사멸 효과를 나타내었다(도 11b).

본 발명의 TRAIL 카세트를 포함하는 재조합 벡터 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114-281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281)는 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜-매개 형질 감염 및 바이러스 매개-형질 도입(Wolff, J.A. Gene therapeutics. Wolff, J. A (Eds.), Birkhauser Boston press, Cambridge, MA. (1994))과 같은 다양한 방법에 의해 일시적으로 또는 안정하게, 배양 세포를 포함한 생물학적 시스템내로 도입되어 생물학적 활성 rTRAIL 단백질을 생성할 수 있다.

또한, pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114-281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114-281) 벡터는 아데노-관련 바이러스의 통상적인 생성 방법(Samulski, R.J., Chang, L.S. & Shenk, T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. J. Virol. 63, 3822-3828 (1989)) 또는 보조 플라스미드를 이용한 무(無)-아데노-관련 바이러스 생성 방법(Xiao, X., Li, J. & Samulski, R. J. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol. 72, 2224-2232 (1998). Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. Hum. Gene Ther. 9, 2745-2760 (1998))에 의한 AAV 입자 생산에 이용될 수 있다.

본 발명은 이와 같은 TRAIL 카세트를 포함하는 pCMVdw 벡터와 pAAVdw 벡터를 암 등의 치료를 위해 주사제 형태로 전신 또는 근육내로 투여하는 것을 하나의 특징으로 한다.

구성형으로 rTRAIL을 발현하는 pCMVdw 벡터는 필요할 때마다 체내로 투여될 수 있다. 유도성으로 rTRAIL을 발현하는 pAAVdw 벡터 역시 필요할 때마다 전신 또는 근육내로 투여될 수 있으며 환자가 유도 인자인 테트라사이클린 또는 독시사이클린을 섭취하게 되면 이들에 의해 rTRAIL 유전자의 발현이 유도되어 TRAIL이 체내에서 생성되어 순환계로 분비되게 된다.

본 발명은 또한 rTRAIL 발현 카세트를 함유한 재조합 pAAVdw 벡터가 패키징된 AAV 입자를 이용한 유전자 치료를 하나의 특징으로 한다.

AAV 입자는 근육세포를 매우 잘 형질 도입하는 것으로 알려져 있으므로 유전자 치료법에 이용될 경우 주로 근육내 주사 형태로 투여된다. 본 발명의 rTRAIL 카세트를 포함하고 있는 AAV 입자가 약물로 사용될 경우, 역시 근육내 주사 형태로 투여될 수 있다. 이 때 환자에게 투여될 AAV 입자의 적정 수는 환자의 체중 kg당 10^{12} 정도이다. 투여된 AAV 입자내의 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 rTRAIL 발현 카세트는 사람 게놈에 삽입되어 존재하게 되며, 안정적인 장기간으로 rTRAIL의 발현을 가능케 한다. 이로써 환자에 대한 한 번의 투여로 환자는 테트라사이클린이나 독시사이클린을 복용함으로써 자기 몸에서 rTRAIL 발현을 거의 영구적으로 실현시킬 수 있다. 테트라사이클린과 독시사이클린은 경구투여가 가능한 저렴한 항생제이므로, 환자는 간단히 값싼 유도 인자를 섭취하는 것만으로 rTRAIL을 필요할 때마다 자체 생산할 수 있게 되어 장기간에 걸쳐 경제적이고 효과적으로 치료를 받을 수 있게 된다.

이와 같은 pAAVdw 벡터는 TRAIL외의 다른 임의의 유전자의 유도성 발현을 위해 이용될 수 있으며, 그 유전자가 질병 치료용 단백질을 암호하는 것일 경우 그 유전자를 표적 유전자로 포함하는 pAAVdw 벡터와 이 벡터가 패키징된 바이러스는 역시 목적하는 질병의 유전자 치료를 위해 이용될 수 있는 바, 이러한 pAAVdw 벡터를 이용한 질병 치료 역시 본 발명의 하나의 특징을 구성한다.

또한, SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)를 포함하는 본 발명의 DNA 카세트는 그 발현을 위해 본 발명의 pCMVdw와 pAAVdw 벡터의 CMV 프로모터의 기능을 대신할 수 있는 임의의 프로모터 (예, 시미안 바이러스(SV) 40 프로모터, 라우스 사르코마 바이러스(RSV)의 Long Terminal Repeat(LTR))를 장착한 임의의 플라스미드 발현 벡터 및 바이러스 발현 벡터(예, 아데노바이러스, 아데노 - 관련 바이러스, 레트로 바이러스 및 허피스 바이러스)가 이용될 수 있으며, 이들 역시 본 발명의 일부를 구성한다.

SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)를 포함하는 재조합 발현 벡터는 칼슘 포스페이트 침전법을 이용하여 DNA만으로, 리포솜 - 매개 형질 감염 및 바이러스 - 매개 형질 도입(Wolff, J.A. Gene therapeutics. Wolff, J. A (Eds.), Birkhauser Boston press, Cambridge, MA. (1994))과 같은 다양한 방법에 의해 세포를 포함한 생물학적 시스템으로 전달될 수 있다.

단지 분비 신호만이 pAAVdw 벡터내에 들어가 있는 pAAVdwSEC2와 pAAVdwSEC(CV) 벡터는 생물학적 활성을 위하여 분비를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있다. 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 또한 그 유전자를 발현시키기 위하여 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다. 외래 유전자를 포함하는 이들 벡터는 AAV 입자내로 패키징될 수 있다.

ILZ 서열이 pAAVdw 벡터내로 혼입된 pAAVdwILZ는 그 생물학적 활성을 위하여 트라이머화를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있다. 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 또한 그 유전자를 발현시키기 위하여 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다. 외래 유전자를 포함하는 이들 벡터는 AAV 입자내로 패키징될 수 있다.

분비 신호와 ILZ 서열이 pAAVdw 벡터내로 혼입된 pAAVdwSEC2ILZ와 pAAVdwSEC(CV)ILZ 벡터는 그 생물학적 활성을 위하여 분비와 트라이머화를 필요로 하는 생성물을 암호하는 임의의 외래 유전자를 발현하기 위하여 이용될 수 있다. 외래 유전자를 함유한 이들 벡터는 또한 그 유전자를 발현시키기 위하여 배양된 세포내로 일시적으로 또는 안정하게 형질 감염될 수 있다. 외래 유전자를 포함하는 이들 벡터는 AAV 입자내로 패키징될 수 있다.

한편, 본 발명은 TRAIL 단백질과 ActD를 포함하는 암 치료용 약제를 제공한다.

일반적으로, 암 치료에 있어서 조합 치료는 개별 치료에 비해 더 나은 예후를 생성한다. 많은 화학 암치료제가 유효 투여량에서 세포 독성 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 낮은 투여량의 화학 암치료제가 rTRAIL을 강화시킬 수 있다면(특히, TRAIL - 내성 암에 대하여), 이 조합 치료는 rTRAIL 단독 치료보다 우수할 것이다. 화학 암치료제 ActD는 다양한 암세포주에서 TRAIL - 유도 어팍토시스를 크게 증진시켰다. ActD는 RNA 폴리머라제 II의 기능을 억제하여 mRNA 합성을 차단하는 것으로 알려져 있다. ActD의 증진 활성화는 mRNA 합성을 차단하기 위하여 일반적으로 이용되는 투여량의 1/10인 100ng/ml에서 얻어졌다. ActD는 p53 발현을 극적으로 유도했으나, TRAIL 작용에 관련된 신호 성분들에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Seol, D.W., Seol, M.H. & Billiar, T.R. Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis independent of p53 status.manuscript in preparation). 화학 암치료제 또는 방사선을 이용한 암 치료에서는 정상 p53가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, rTRAIL/ActD는 p53의 상태와는 무관하게 표적 세포를 효과적으로 사멸시켰다. 더욱이, rTRAIL 단독에 대해 내성을 보이는 많은 암 세포주가 rTRAIL/ActD에 의해서는 효과적으로 사멸되었다. 이 결과는 인체 암의 50% 이상이 다양한 p53 돌연변이를 함유한다는 사실(Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.a. p53 function and dysfunction.Cell70, 523 - 526 (1992).Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. p53 mutations in human cancers.Science253, 49 - 53 (1991))과 생체내에서 rTRAIL의 안전성을 생각할 때, 낮은 투여량의 ActD에 의해 강화된 rTRAIL은 현저히 개선된 암 치료제가 될 수 있다.

ActD는 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질과만 이용될 수 있을 뿐만 아니라,pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281), pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281),pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)과 같은 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질을 발현하는 임의의 플라스미드와 함께 이용될 수 있다.

ActD는pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)를 이용하여 생성된 AAV 입자와 함께 이용될 수 있다.

ActD는 재조합 사람 TRAIL(114 - 281)의 어팍토시스 활성을 증진시키는 다른 암치료제를 포함한 화학 치료제로 치환될 수 있다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1

SS - TFD - TRAIL(아미노산 114 - 281) 카세트의 구성

먼저, SEC2 시그널 서열(도1a)과 SEC(CV) 시그널 서열(도1b)을 화학적으로 합성하였으며, 삽입을 용이하게 하기 위해 각각의 말단에 KpnI(5')과 SmaI/XmaI(3') 사이트를 첨가하였다. 각각의 시그널 서열을 KpnI과 XmaI로 절단된 pCMVdw 벡터(도5)에 삽입시켜 pCMVdwSEC2와 pCMVdwSEC(CV) 벡터를 구성하였다.

이어서, 두 번째 성분인 트라이머 형성 도메인인 ILZ 서열(도3) 역시 화학적으로 합성하였고 삽입을 용이하게 하기 위해 각각의 말단에 SmaI/XmaI(5')과 EcoRI(3') 사이트를 첨가하였다. 이미 형성된 pCMVdwSEC2와 pCMVdwSEC(CV) 벡터를 XmaI과 EcoRI로 절단한 다음 그 절단부위에 합성된 ILZ 서열을 삽입시킴으로써 pCMVdwSEC2ILZ와 pCMVdwSEC(CV)ILZ 벡터를 구성하였다.

마지막으로, 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질을 암호하는 cDNA 서열은 다음과 같이 얻어졌다. 먼저, 프라이머 세트(센스 5' - CCCGGTACCATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGG - 3' 프라이머와 안티센스 5' - CCCGAATTCTTACCCA ACTAAAAAGGCCCGGAA - 3')를 이용하여 사람 간세포 cDNA Library(Invitrogen)를 주형으로 이용한 PCR로부터

사람 TRAIL의 ORF(open reading frame)를 얻었다. PCR은 95℃에서 5분 동안 주형을 변성시킨 다음, 95℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분의 조건으로 35 사이클 동안 수행하였다. PCR 생성물을 KpnI과 EcoRI으로 절단한 다음 아가로스 젤에서 전기영동 후 분리 정제하여 KpnI과 EcoRI으로 절단된 pCMVdw 벡터에 결찰시킴으로써 pCMVdwTRAIL을 구축하였다. 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질을 암호하는 cDNA 서열은 프라이머 세트 (센스 5' - CCG AATTCGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAG - 3' 프라이머와 안티센스 5' - CGTAGCGGCCGCTTAGCCAACTAAAA AGGCCCGAAA - 3' 프라이머)와 pCMVdwTRAIL을 주형으로 이용한 PCR을 통해 얻어졌다. PCR은 95℃에서 5분 동안 주형을 변성시킨 다음, 95℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분의 조건으로 35 사이클 동안 수행하였다. PCR 생성물을 EcoRI(5')과 NotI(3')으로 절단하여 pCMVdwSEC2ILZ와 pCMVdwSEC(CV)ILZ의 EcoRI(5')과 NotI(3') 사이트에 삽입시킴으로써 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)과 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)을 구성하여 벡터내에 구축된 TRAIL 카세트를 제조하였다.

제조된 재조합 벡터 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)는 2000년 6월 9일자로 기탁번호 PTA - 2018번으로, pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)는 2000년 6월 9일자로 기탁 번호 PTA - 2019번으로 ATCC에 기탁하였다.

실시예 2

TRAIL 카세트를 포함하는 재조합 발현벡터 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281) 또는 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)의 구성 및 그 효과의 시험

TRAIL 카세트에 의한 TRAIL 생성 및 분비 효과를 확인하기 위하여, pCR3 벡터(Invitrogen)의 다중 클로닝 부위(HindIII부터 ApaI까지)를 도 5의 서열로 치환시켜 구성형 발현 벡터인 pCMVdw를 제조하였다.

먼저 pCR3 벡터를 HindIII와 ApaI으로 절단한 후, 아가로스 젤 전기영동에 의해 벡터 부분을 분리, 정제하였다. 그리고, 화학 합성에 의해 제조된 도 5의 서열을 상기에서 분리, 정제된 pCR3 벡터에 결찰시켜 pCMVdw 벡터를 구성하였다.

제조된 pCMVdw 벡터에 다양한 유전자를 삽입하여 도 8g에 나타난 구성을 갖는 다양한 재조합 벡터를 제조하였다.

SEC2 서열(도 8a, c, e, 및 g)을 pCMVdw 벡터의 KpnI(5')과 SmaI/XmaI(3') 부위에 클로닝하였다.

아미노 말단에 부가의 두 개의 아미노산(Met과 Gly)을 함유하는 His - tag 서열(도 8b, g)을 pCMVdw 벡터의 KpnI(5')과 SmaI/XmaI(3') 부위에 클로닝시켰다. His - tag 서열은 Ni과 Co와 같은 2가 양이온에 높은 친화성을 가져, 단백질의 아미노 말단 또는 카복시 말단에 융합되면 친화성 수지에 의한 단백질의 친화성 정제를 촉진시킨다. 본 발명에서 His - tag 서열은 해독 개시 부위를 제공하기 위하여 이용되었다.

아미노 말단에 부가의 아미노산(Met)을 함유하는 FLAG - tag 서열(도 8d, g)을 pCMVdw 벡터의 KpnI(5')과 SmaI/XmaI(3') 부위에 클로닝시켰다. FLAG - tag 서열은 항 - FLAG 항체에 의해 특이적으로 인지되며, 단백질에 융합되면 FLAG 항체에 의한 단백질 친화성 정제를 촉진한다. 표적 단백질에 대한 특이적 항체가 없을 경우, FLAG 서열을 표적 단백질에 융합시키면 항 - FLAG 항체를 이용하여 발현된 단백질을 검출할 수 있다. 본 발명에서 FLAG 서열은 해독 개시 부위를 제공하기 위하여 이용되었다.

SEC(CV) 서열(도 8f, g)을 pCMVdw 벡터의 KpnI(5')과 SmaI/XmaI(3') 부위에 클로닝시켰다.

ILZ 서열을 SmaI/XmaI(5')과 EcoRI(3') 부위에 삽입하여 각각 SEC2 서열(도 8a,e 및 g), FLAG - tag 서열(도 8d와 g), 또는 SEC(CV) 서열(도 8f와 g)에 융합시켰다.

사람 TRAIL(114 - 281) cDNA를 SmaI/XmaI(5')과 EcoRI(3') 부위에 삽입함으로써 His - tag 서열(도 8b와 g), S EC2 서열(도 8c와 g), FLAGILZ 서열(도 8d와 g)에 융합시켰으며, EcoRI(5')과 NotI(3') 부위에 삽입함으로써 SE C2ILZ 서열(도 8e와 g), 또는 SEC(CV)ILZ 서열(도 8f와 g)에 융합시켰다.

그 결과 얻어진 재조합 벡터들이 도 8g에 나타나있다.

이렇게 구성된 각 발현 벡터들을 HeLa 세포 사멸 활성에 대해 시험하였다. 형질감염은 칼슘포스페이트 기법이나 리포좀을 이용해 이루어 졌다. 칼슘포스페이트 기법은 CellPfect 형질감염 키트(Pharmacia)나 표준 방법(Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))을 이용하였으며, 리포좀으로는 GenePORTER(Gene Therapy System) 또는 LipofectAMINE(Life Technologies)을 이용하였다. 사용된 모든 방법에서 비교할 만한 결과가 도출되었다.

도 8g에 예시된 실험을 수행하기 위하여, 각 플라스미드(2 μ g)를 TRAIL 내성 세포인 293 세포내로 칼슘 포스페이트 기법을 이용하여 일시적 형질감염시켰다. 형질 감염후 36시간 후에, 각 배양 배지를 취하여 HeLa 세포 사멸 활성을 시험하였다. 6월에 도말된 HeLa 세포를 4시간동안 각각의 시험 배양 배지와 함께 항온 처리한 결과 pCMVdwSEC2ILZ TRAIL(114 - 281) 또는 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)의 형질 감염에 의해 얻어진 배양 배지만이 HeLa 세포를 효과적으로 사멸시켰다. 크리스탈 바이올렛 염색법(Seol, D.W. & Billiar, T.R. A caspase - 9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. J. Biol. Chem. 274, 2072 - 2076 (1999))을 이용하거나 현미경하에서의 일반적인 생존 세포 계수에 의한 세포 생존성 분석(Pan, G. et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 276, 111 - 113 (1997). Pan, G. et al. An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL. Science 277, 815 - 818 (1997))은 50%(pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281))와 90%(pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281))의 HeLa 세포가 4시간내에 사멸함을 보여주었다.

이러한 일시적 형질 감염과 효과 시험(도 8g)은 본 발명의 TRAIL DNA 카세트가 세포외로 분비되어 효과적으로 HeLa 세포를 사멸시킬 수 있는 분비성 TRAIL 단백질을 생성시킬 수 있음을 명확하게 보여준다.

실시예 3

TRAIL 단백질의 발현, 분비 및 절단의 시험

TRAIL(114 - 281) 단백질의 발현, 분비 및 특이적 절단을 검토하였다. SEC2 분비 신호를 함유한 SEC2ILZTRAIL(114 - 281) 단백질과 SEC(CV)를 함유한 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) 단백질은 배양 배지내로 분비되었으나, FLAGILZTRAIL(114 - 281) 단백질은 배지내로 분비되지 않았다(도 9a 및 b).

FLAGILZTRAIL(114 - 281) 단백질은 전체 세포 용해물에서만 검출가능하였으며(도 9b), 이것은 TRAIL(114 - 281) 단백질의 분비와 생물학적 기능을 위해 분비 신호가 필요함을 나타낸다.

pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)에 의해 생성된 분비 ILZTRAIL(114 - 281) 단백질은 시토졸 ILZTRAIL(114 - 281) 단백질보다 크기가 작은 것으로 확인되었다. 이 결과는 특이적 퓨린 매개 절단이 일어났음을 보여준다.

도 9a 및 9b의 "TRAIL(114 - 281) 단백질"은 이전에 보고된(Seol, D.W. & Billiar, T.R. A caspase - 9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. J. Biol. Chem. 274, 2072 - 2076 (1999). Seol, D.W. & Billiar, T.R. Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand activity. Cancer Res. 60, 3152 - 3154 (2000)) pETdwHisTRAIL(114 - 281) 박테리아 발현 플라스미드를 가진 박테리아 세포로부터 정제된 재조합 단백질을, 이 단백질은 TRAIL 항체를 위한 양성 대조군으로 이용되었다.

융합된 보조 서열(FLAG - ILZ 또는 SEC2ILZ)이 있거나 없는 모든 TRAIL(114 - 281) 단백질은 표준 웨스턴 블롯 분석으로 검출하였다.

사람 ILZTRAIL(114-281) 단백질은 DNA서열 " SEC2ILZTRAIL(114-281)" 또는 " SEC(CV)ILZTRAIL(114-281)" 의 일시적 또는 안정적 형질 감염에 의해 생성될 수 있다. 분비된 또는 시토졸 ILZ-융합된 TRAIL(114-281) 단백질은 통상적인 컬럼 정제를 포함한 다양한 방법에 의해 정제될 수 있다. " SEC2ILZTRAIL(114-281)" 또는 " SEC(CV)ILZTRAIL(114-281)" 는 또한 친화성 정제를 위해 HA-tag 또는 Myc-tag과 같은 부가적인 친화성 tag 서열에 융합될 수 있다. 정제된 ILZTRAIL(114-281) 단백질이 원래의 사람 TRAIL(114-281) 단백질의 생물학적 기능을 가지면, 그 단백질은 본 발명에 속한다.

실시예 4

pAAVdw 벡터의 제조 및 활성 테스트

삽입된 목적 유전자를 피드-포워드 증폭 루프 형식의 Tet-On 시스템으로 유도성으로 발현할 수 있는 pAAVdw 벡터를 제조하였다.

pAAVdw 벡터 제조에 앞서 pAAVdwGFP 벡터 제조를 위해, 먼저 pXX-UF1 벡터(도 10a)를 SalI로 절단하여 pXX-UF1으로부터 " POenh-P_{TK}-Neo^r" 영역을 제거하여 " pXX-UF1△SalI" 벡터를 구성하였다. 이어서 " pXX-UF1△SalI" 벡터를 KpnI과 XhoI로 절단하여 P_{CMV} 영역을 결실시켰다(도 10a).

테트라사이클린 반응 요소(TetO)와 CMV 최소 프로모터(mP)(도 10a, b)를 함유하는 pTRE 플라스미드(Clontech)의 308번째 뉴클레오타이드 " C" (도 10b)를 퀵 체인지 점 돌연변이 방법(Stratagen)에 의해 프라이머 세트(센스 5'-GTCGAGCTCGGTAGCCGGGTCGAGTAG-3', 안티센스 5'-CTACTCGACCCGGCTACCGAGCTCGAC-3', 밑줄친 뉴클레오타이드가 돌연변이되는 뉴클레오타이드임)를 이용하여 " G" (도 10c)로 돌연변이시켰다. 이 점 돌연변이는 내부의 KpnI과 SmaI/XmaI 부위를 동시에 억 아웃시켰다. 프라이머 세트(센스 5'-CCCGGTACCCGAGGCCCTTTCGTCTCGAGTTTACC-3' 밑줄친 뉴클레오타이드가 돌연변이되는 뉴클레오타이드임, 안티센스 5'-CCCCTCGAGCCGAGGCTCGATCGGTCCCGGTG-3')와 주형으로서 돌연변이된 pTRE 플라스미드를 이용하여, PCR을 수행하여 좌측편의 " TetO-mP" 서열을 제조하였다(도 10c). XhoI 제한 부위의 돌연변이는 5' PCR 프라이머를 화학적으로 합성할 때 첫 번째 뉴클레오타이드 " C" 를 " G" 로 변화시킴으로써 이루어졌다. 이 PCR 생성물을 KpnI과 XhoI로 절단하여 정제하고 KpnI/XhoI-절단된 " pXX-UF1△SalI" 벡터에 결찰시켜 " pXXUF1△SalI/TetO-mP" 벡터를 구성하였다.

pAAVdw 벡터의 우측편의 " TetO-mP-rtTA" 를 암호하는 DNA서열을 제조하기 위하여 pTet-On 플라스미드(Clontech)를 EcoRI과 BamHI로 절단하여 rtTA 오픈 리딩 프레임(ORF)(도 10e)을 가진 DNA를 분리하였다. EcoRI-BamHI 영역을 치환시킴으로써 TetO-mP를 함유한 pTRE 플라스미드내로 이 rtTA ORF를 삽입시켜 " pTRE-rtTA" 벡터를 구성하였다. SalI-함유 프라이머 세트(센스 5'-CCCGTCGACCTCGAGTTTACCACTCCCTATCAG-3', 안티센스 5'-CCCGTCGACATCATGTCTGGATCCTCGCGCCCC-3')를 이용한 PCR에 의해 pTRE-rtTA 벡터의 " TetO-mP-rtTA" 영역을 증폭시키고, 블런트 말단을 만든 다음, SmaI-절단된 pGEX-2T(Pharmacia) 벡터에 결찰시켜 " pGEX-2T/TetO-mP-rtTA" 플라스미드를 구성하였다. rtTA내의 내부 SalI 제한 부위를 프라이머 세트(센스 5'-CACACGCGCAGACTATCGACGGCCCCCCCCG-3', 안티센스 5'-CGGGGGGGCCGTCGATAGTCTGCGCGTGTG-3', 밑줄친 뉴클레오타이드가 돌연변이되는 뉴클레오타이드임)를 이용하여 돌연변이시킨 후(도 10e, 화살표), " TetO-mP-rtTA" 를 함유하는 그 DNA(도 10f)를 SalI로 절단하고 정제하여 SalI-절단된 " pXXUF1△salI/TetO-mP" 벡터에 결찰시켜 pAAVdwGFP 벡터를 구성하였다. 이어서 pAAVdwGFP 벡터를 NotI로 절단하여 GFP 부위를 제거한 다음 자가-결찰시킴으로써 pAAVdw 벡터를 구축하였다. 제조된 pAAVdw 벡터는 gfp 유전자를 포함하는 pAAVdwGFP 형태로 2000년 6월 20일자로 기탁번호 PTA-2102번으로 ATCC에 기탁하였다.

좌측 편의 TetO는 7개의 반복되는 테트라사이클린 반응 요소(TRE)를 함유하는 반면(도 10c), 우측 편의 TetO는 6개의 반복되는 TRE를 함유한다(도 10d).

이와 같이 제조된 pAAVdw 벡터는 전술한 바와 같이, 테트라사이클린/독시사이클린에 반응하여 피드-포워드 증폭 루

프로에 의해 표적 유전자의 발현이 유도될 수 있도록 고안되었다(도 10g). CMV 최소 프로모터(mP)는 기본적인 농도의 표적 유전자(예, pAAVdwGFP의 경우 gfp), 및 TetO 결합 도메인과 전사 활성화 도메인의 융합 단백질인 rtTA 단백질을 발현한다. 테트라사이클린/독시사이클린이 없는 경우, rtTA 단백질은 TetO 인핸서 영역에 결합할 수 없다. 대조적으로, rtTA 단백질과 결합된 테트라사이클린 또는 독시사이클린은 최소로 존재하는 rtTA 단백질이 TetO에 결합하여 전사 기작을 활성화시키도록 한다. 그 결과, 더 많은 rtTA 단백질이 발현된다. 이러한 피드 포워드 증폭 루프는 표적 유전자의 최대 발현이 가능하도록 한다.

pAAVdw백터에 의한 임의의 표적유전자의 테트라사이클린 유도성은 gfp 유전자를 이용하여 시험되었다. 이를 위하여, pAAVdwGFP 백터 2 μ g을 6웰에 도말된 293 세포내로 일시적 형질감염시켰다. 형질 감염 24시간 후에, 테트라사이클린(1 μ g/ml)을 세포 배양 배지에 첨가하고 24시간동안 배양하였다. 배양 배지(30 μ l)를 수거해서 로딩 버퍼와 혼합하여 가열한 후 SDS젤에 로딩하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고, GFP - 인식 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석하였다. 그 결과는 표적 유전자 발현이 테트라사이클린에 의해 강하게 유도됨을 나타낸다(도 10h). 이 결과는 또한 gfp 유전자를 대신한 임의의 다른 유전자도 gfp처럼 pAAVdw 백터에 의해 발현될 경우 테트라사이클린에 의해 유도될 수 있음을 의미한다.

실시예 5

pAAVdw 백터를 이용한 재조합 TRAIL(114 - 281)단백질의 발현

pAAVdw 백터를 이용하여 재조합 TRAIL(114 - 281)단백질을 발현시키기 위하여, 프라이머 세트(센스 5' - CCTAGC GGCCGCTAGAGAACCCACTGCTTACTGG - 3' 프라이머와 안티센스 5' - CGTAGCGGCCGCTTAGCCAACTAAA AAGGCCCGAAA - 3' 프라이머)를 이용한 PCR에 의해 pCMVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)을 주형으로 하여 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)을, 그리고 pCMVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)을 주형으로 하여 pCSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)을 위한 DNA 서열을 준비한 다음 pAAVdw 백터내 NotI 사이트에 클로닝하였다.(도 11a).

pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)에 의해 발현된 단백질의 기능적 활성을 시험하기 위하여, 각 플라스미드 2 μ g을 6웰에 도말된 293 세포내로 칼슘 포스페이트 방법을 이용해 일시적으로 형질감염시켰다. 형질 감염 24시간 후, 테트라사이클린(1 μ g/ml)을 세포 배양 배지에 첨가하고 24시간동안 배양하였다. HeLa 세포에서 어팍토시스 활성을 시험하기 위하여 배양 배지를 수거하였다. HeLa 세포를 12웰에 도말하였다. 도말 후 24시간 후에, HeLa 세포의 배양 배지를 시험 배양 배지(1ml)로 치환시켰다. 4시간 동안 배양한 후, 전형적인 어팍토시스 형태로 사멸한 세포를 현미경하에서 계수하거나 또는 크리스탈 바이올렛을 이용한 분광광도 분석에 의해 생존성을 측정하였다. 그 결과는 pAAVdw 백터에 의한 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)의 발현이 pCMVdw 백터에 의해 발현된 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)과 비교할 만한 어팍토시스 활성을 가짐을 보여주었다(도 11b). 따라서 이 결과는 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) 발현이 GFP 발현에서 이미 보였던 것처럼 테트라사이클린에 의해 성공적으로 유도되며 또한 배양 배지로 분비됨을 의미한다.

실시예 6. 바이러스 패키징 실시 및 치료 효과 시험

GFP, SEC2ILZTRAIL(114 - 281) 또는 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) DNA 서열을 포함하는 테트라사이클린/독시사이클린 - 유도성 발현 백터 pAAVdw를 보조 플라스미드를 이용한 일시적 형질감염 방법으로 AAV 입자내로 패키징시켰다.

pAAVdwGFP(2ug), pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281) (2ug) 또는 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) (2ug) 벡터를 보조 플라스미드인 pDG 벡터 (Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. & Kleinschmidt, J.A. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. Hum. Gene Ther.9, 2745 - 2760 (1998).) (6 μ g)와 함께 6웰에 도말된 293 세포내로 칼슘 포스페이트 침전법을 이용하여 일시적 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 배양배지를 제거한 다음 형질감염된 293 세포를 수거하여 각각 400 μ l의 PBS에 재현탁한 다음, 3회 동결 - 해동시킴으로써 세포를 파괴시켰다.

정제되지 않은 전체 세포 분해물을 상온에서 12,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 패키징된 AAV 입자를 포함하는 상층액을 수거하여 테트라사이클린에 대한 유도성 실험과 치료 효과 실험을 병행하였다.

6웰에 약 50%의 융합성에 이른 293 세포에 패키징된 AAV 입자를 포함하는 400 μ l의 상층액을 둘로 나누어서 웰에 첨가한 다음, AAV 입자가 표적 세포내로 유입되도록 하였다. 6시간 후, AAV입자를 포함하는 표적 세포 배양 배지를 제거하고 새 표적 세포 배양 배지로 2회에 걸쳐 세척한 다음, 새 표적 세포 배양 배지로 12시간 항온 처리하였다.

1 μ g/ml 농도로 테트라사이클린을 배양 배지에 첨가하여 48시간 추가 항온 처리한 다음, 배양 배지를 수거하여 HeLa 세포 사멸 능력을 측정하였다.

12개의 웰에 도말된 HeLa 세포의 배양 배지를 시험 배양 배지(1ml)로 치환하고 12시간 항온 처리한 다음 크리스탈 바이올렛을 이용한 분광광도 분석법이나 현미경하에서 전형적인 어팍토시스 형태를 보이며 사멸된 세포를 계수함으로써 세포 생존성을 측정하였다(도 12).

도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 Tet - On 시스템과 함께 바이러스에 패키징된 SEC2ILZTRAIL(114 - 281) 또는 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281) 서열에 의해서도 동일하게 표적세포 사멸 기능이 나타남을 확인할 수 있다. 따라서 이 결과는 pAAVdwSEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 pAAVdwSEC(CV)ILZTRAIL 벡터에서 확인한 것처럼 AAV 입자에 의해서도 SEC2ILZTRAIL(114 - 281)와 SEC(CV)ILZTRAIL(114 - 281)가 테트라사이클린에 의해 유도성으로 발현되며 또한 배양배지로 분비됨을 의미한다.

이미 많은 연구결과가 보여준 것처럼 근육세포는 AAV 입자의 매우 좋은 표적 조직이다. AAV 입자에 의해 표적 유전자가 형질 도입될 경우 근육세포는 거의 영구적으로 그 표적 유전자를 발현시킴이 잘 알려져 있다.

그러므로 상기 결과는 AAV 입자를 이용해 본 발명의 재조합 rTRAIL 생성을 위한 카세트를 생체에 적용할 경우, 거의 영구적으로 rTRAIL을 테트라사이클린 이나 독시사이클린 유도성 방식으로 근육세포에서 생성하여 순환계로 분비시킬 수 있음을 의미한다.

실시예 7

조합 치료

일반적으로, 암 치료에서 조합 치료는 개별 치료보다 더 나은 예후를 생산하는 바, rTRAIL 단백질과 화학 암치료제인 ActD의 조합 치료의 효과를 시험하였다.

재조합 사람 TRAIL(114 - 281)단백질의 ActD - 증진된 어팍토시스 활성을 시험하기 위하여, 각 세포주를 12웰에 도말시키고, 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질(100ng/ml)만, 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질(100ng/ml)과 ActD(100ng/ml), 또는 ActD(100ng/ml)만, 12시간동안 배양시켰다. 크리스탈 바이올렛을 이용한 분광광도 분석으로 세포 생존성을 측정하였다. 그 결과가 도 13에 나타나 있다. "ND" 는 " 결정되지 않았음" 을 의미한다.

도 13으로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질의 어팍토시스 활성은 ActD에 의해 크게 증가되었다. ActD의 도움으로, 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질은 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질만에 대한 내생적 저항성에 무관하게 대부분의 표적 세포를 죽였다.

따라서 ActD에 의해 강화된 재조합 사람 TRAIL(114 - 281) 단백질은 다양한 -암에 대한 치료제가 될 것으로 기대된다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 분비가능한 트라이머 rTRAIL의 생성을 위한 TRAIL DNA 카세트의 구성, pCMVdw 벡터 및 AAV 입자에 패키징 될 수 있는 피드-포워드 증폭 루프 방식의 Tet-On 시스템을 장착한 pAAVdw 벡터의 개발, TRAIL DNA 카세트와 이들 두 벡터의 조합에 의한 재조합 벡터 제조, 및 이들 벡터를 이용한 암 등의 치료에 관한 것이다.

본 발명에서 제조한 pAAVdw 벡터 및 pCMVdw 벡터 및 TRAIL DNA 카세트를 이용한 HeLa Cell에서의 시험결과 만족할 만한 어팍토시스 활성이 나타났으며, pAAVdw 재조합 발현벡터가 패키징된 바이러스의 세포 생존성 측정결과 역시 전형적인 어팍토시스 활성이 나타났다.

따라서 본 발명은 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질의 대량생산에 이용되거나 유전자 치료에 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

분비 시그널 서열(SS), 트라이머 형성 도메인(TFD) 및 TRAIL(114 - 281) 암호 cDNA로 구성되는 분비성 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질 생산을 위한 DNA 카세트.

청구항 2.

제1항에 있어서, 분비 시그널 서열이 SEC2 또는 SEC(CV)인 DNA 카세트.

청구항 3.

제1항에 있어서, 트라이머 형성 도메인이 ILZ인 DNA 카세트.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 DNA 카세트를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 5.

제4항의 재조합 발현 벡터로 형질 감염된 세포주.

청구항 6.

제5항의 세포주에 의해 생산된 분비성 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질.

청구항 7.

삽입되는 외래 유전자를 구성형으로 발현할 수 있는 포유류 발현 벡터 pCMVdw 벡터.

청구항 8.

제7항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 세포외로 분비될 수 있도록 분비 시그널 서열 SEC2 또는 SEC(CV)를 더 포함하는 pCMVdw 벡터.

청구항 9.

제7항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 트라이머를 형성할 수 있도록 트라이머 형성 도메인 ILZ를 더 포함하는 pCMVdw 벡터.

청구항 10.

제7항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 세포외로 분비되고 트라이머를 형성할 수 있도록 시그널 서열 SEC2 또는 SEC(CV)와 트라이머 형성 도메인 ILZ를 더 포함하는 pCMVdw 벡터.

청구항 11.

제4항에 있어서, 발현 벡터가 pCMVdw인 재조합 발현 벡터.

청구항 12.

삽입되는 외래 유전자를 Tet - On 시스템의 피드 - 포워드 증폭 루프에 의해 테트라사이클린/독시사이클린 유도성으로 발현할 수 있는 아데노 - 관련 바이러스(AAV) 발현 벡터인 pAAVdw 벡터.

청구항 13.

제4항에 있어서, 발현 벡터가 pAAVdw 벡터인 재조합 발현 벡터.

청구항 14.

제12항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 세포외로 분비될 수 있도록 분비 시그널 서열 SEC 2 또는 SEC(CV)를 포함하는 pAAVdw 벡터.

청구항 15.

제12항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 트라이머를 형성할 수 있도록 트라이머 형성 도메인 ILZ를 포함하는 pAAVdw 벡터.

청구항 16.

제12항에 있어서, 삽입되는 외래 유전자에 의해 암호되는 단백질이 세포외로 분비되고 트라이머를 형성할 수 있도록 시그널 서열 SEC2 또는 SEC(CV)와 트라이머 형성 도메인 ILZ를 포함하는 pAAVdw 벡터.

청구항 17.

제13항의 재조합 발현 벡터가 패키징된 바이러스.

청구항 18.

제17항의 바이러스에 의해 형질도입된 세포주

청구항 19.

제18항의 세포주에 의해 생산된 분비성 재조합 트라이머형 TRAIL 단백질.

청구항 20.

제4항, 제11항 또는 제13항의 재조합 발현 벡터를 활성 성분으로서 치료 유효량 포함하는 암 등의 치료용 약학 조성물.

청구항 21.

제17항의 바이러스를 활성 성분으로서 치료 유효량 포함하는 암 등의 치료용 약학 조성물.

청구항 22.

제20항 또는 제21항에 있어서, ActD를 더 포함하는 약학 조성물.

도면 1a

```

ATG GGT CGA GGG CGT CTG CTG GAG ATC GCC CTG GGA TTT ACC GTG CTT TTA GCG
m et gly arg gly arg leu leu glu ile ala leu gly phe thr val leu leu ala

TCC TAC ACG AGC CAC GGG GCG GAC
ser tyr thr ser his gly ala asp
  
```

도면 1b

```

ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG CCC TGG
m et ala thr gly ser arg thr ser leu leu leu ala phe gly leu leu cys leu pro trp

CTT CAA GAG GGC AGT GCC TCC GCT CGG AAC AGG CAG AAG CGC
leu glu glu gly ser ala ser ala arg asn arg glu lys arg

```

Furin-specific cleavage sequence

도면 2

```

TCC GCT CGG AAC AGG CAG AAG CGC XXX
ser ala arg asn arg glu lys arg xxx

```

↑

도면 3

```

AGA ATG AAG CAG ATC GAG GAC AAA ATT GAG GAA ATC CTG TCC AAG ATT TAC CAC
arg m et lys glu ile glu asp lys ile glu glu ile leu ser lys ile tyr his

ATC GAG AAC GAG ATC GCC CGG ATT AAG AAA CTC ATT GGC GAG AGG
ile glu asn glu ile ala arg ile lys lys leu ile gly glu arg

```

도면 4

GTG AGA GAA AGA GGT CCT CAG AGA GTA GCA GCT CAC ATA ACT GGG ACC AGA GGA AGA AGC
 val arg glu arg gly pro gh arg val ah ah his ile thr gly thr arg gly arg ser
 AAC ACA TTG TCT TCT CCA AAC TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC TCC
 asn thr leu ser ser pro asn ser lys asn glu lys ah leu gly arg lys ile asn ser
 TGG GAA TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA TTC CTG AGC AAC TTG CAC TTG AGG AAT GGT GAA
 trp glu ser ser arg ser gly his ser phe leu ser asn leu his leu arg asn gly glu
 CTG GTC ATC CAT GAA AAA GGG TTT TAC TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG
 leu val ile his glu lys gly phe tyr tyr ile tyr ser gh thr tyr phe arg phe gh
 GAG GAA ATA AAA GAA AAC ACA AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT TAC AAA TAC
 glu glu ile lys glu asn thr lys asn asp lys gh met val gh tyr ile tyr lys tyr
 ACA AGT TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT GCT AGA AAT AGT TGT TGG TCT AAA
 thr ser tyr pro asp pro ile leu leu met lys ser ah arg asn ser cys trp ser lys
 GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT TCC ATC TAT CAA GGG GGA ATA TTT GAG CTT AAG GAA AAT
 asp ah glu tyr gly leu tyr ser ile tyr gh gly gly ile phe glu leu lys glu asn
 GAC AGA ATT TTT GTT TCT GTA ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT GAA GCC AGT
 asp arg ile phe val ser val thr asn glu his leu ile asp met asp his glu ah ser
 TTT TTC GGG GCC TTT TTA GTT GGC TAA
 phe phe gly ah phe leu val gly

도면 5

AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTG
 HindIII KpnI BamHI BstXI EcoRI EcoRV BstXI
GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCC
 NotI XhoI XbaI ApaI

도면 6

GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG
 asp tyr lys asp asp asp asp lys

도면 7

CAT CAT CAT CAT CAT CAT
 his his his his his his

도면 8a

ATG GGT CGA GGG CGT CTG CTG GAG ATC GCC CTG GGA TTT ACC GTG CTT TTA GCG TCC TAC
 met gly arg gly arg leu leu glu ile ala leu gly phe thr val leu leu ala ser tyr
 ACG AGC CAC GGG GCG GAC CCC GGG AGA ATG AAG CAG ATC GAG GAC AAA ATT GAG GAA ATC
 thr ser his gly ala asp SmaI/XmaI arg met lys gh ile glu asp lys ile glu glu ile
 CTG TCC AAG ATT TAC CAC ATC GAG AAC GAG ATC GCC CGG ATT AAG AAA CTC ATT GGC GAG
 leu ser lys ile tyr his ile glu asn glu ile ala arg ile lys lys leu ile gly glu
 AGG
 arg

도면 8b

ATG GGG CAT CAT CAT CAT CAT CAT CCC GGG GTG AGA GAA AGA GGT CCT ...
 Met gly his his his his his his SmaI/XmaI val arg glu arg gly pro

Human TRAIL(114-281) of Fig. 4

도면 8c

ATG GGT CGA GGG CGT CTG CTG GAG ATC GCC CTG GGA TTT ACC GTG CTT TTA GCG TCC TAC
 met gly arg gly arg leu leu glu ile ala leu gly phe thr val leu leu ala ser tyr
 ACG AGC CAC GGG GCG GAC CCC GGG GTG AGA GAA AGA GGT CCT ...
 thr ser his gly ala asp SmaI/XmaI val arg glu arg gly pro

Human TRAIL(114-281) of Fig. 4

도면 8d

ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CCC GGG AGA ATG AAG CAG ATC GAG GAC AAA ATT
 met asp tyr lys asp asp asp asp lys SmaI/XmaI arg met lys gh ile glu asp lys ile
 GAG GAA ATC CTG TCC AAG ATT TAC CAC ATC GAG AAC GAG ATC GCC CGG ATT AAG AAA CTC
 glu glu ile leu ser lys ile tyr his ile glu asn glu ile ala arg ile lys lys leu
 ATT GGC GAG AGG GAA TTC GTG AGA GAA AGA GGT CCT ...
 ile gly glu arg EcoRI val arg glu arg gly pro

Human TRAIL(114-281) of Fig. 4

도면 8e

ATG GGT CGA GGG CGT CTG CTG GAG ATC GCC CTG GGA TTT ACC GTG CTT TTA GCG TCC TAC
 met gly arg gly arg leu leu glu ile ala leu gly phe thr val leu leu ala ser tyr
 ACG AGC CAC GGG GCG GAC CCC GGG AGA ATG AAG CAG ATC GAG GAC AAA ATT GAG GAA ATC
 thr ser his gly ala asp SmaI/XmaI arg met lys gh ile glu asp lys ile glu glu ile
 CTG TCC AAG ATT TAC CAC ATC GAG AAC GAG ATC GCC CGG ATT AAG AAA CTC ATT GGC GAG
 leu ser lys ile tyr his ile glu asn glu ile ala arg ile lys lys leu ile gly glu
 AGG GAA TTC GTG AGA GAA AGA GGT CCT ...
 arg EcoRI val arg gh arg gly pro

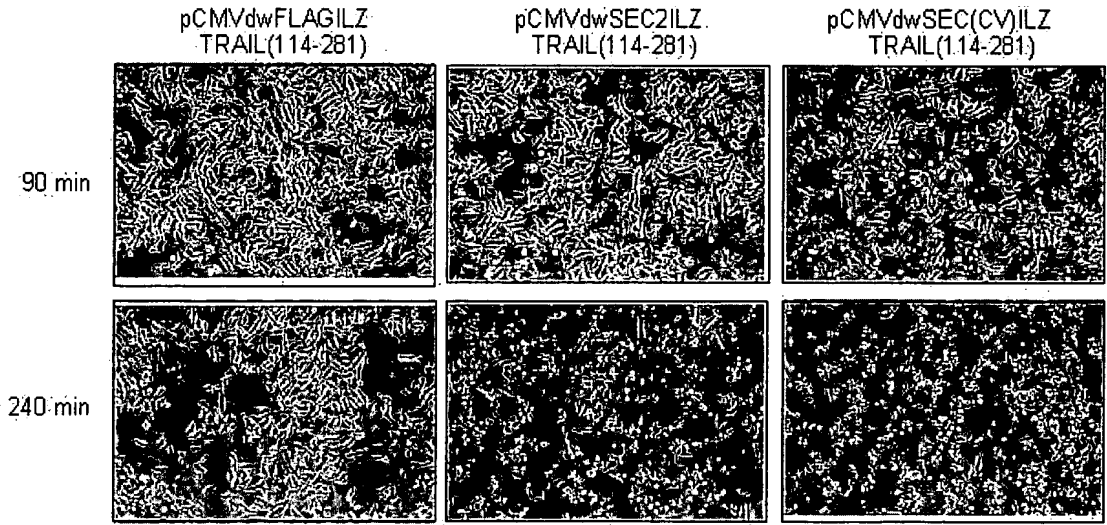
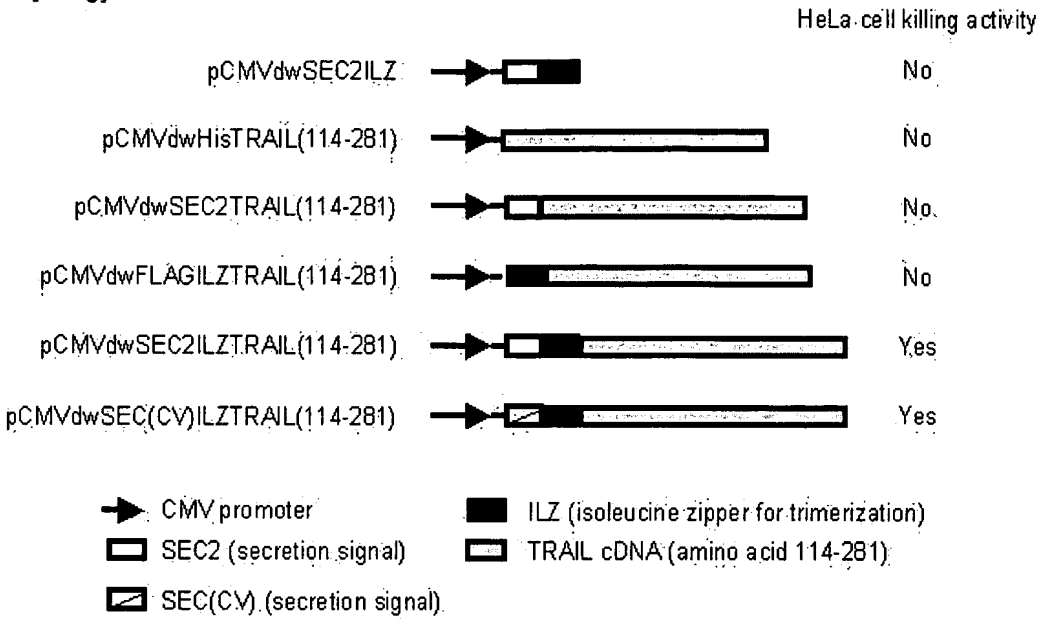
Human TRAIL(114-281) of Fig. 4

도면 8f

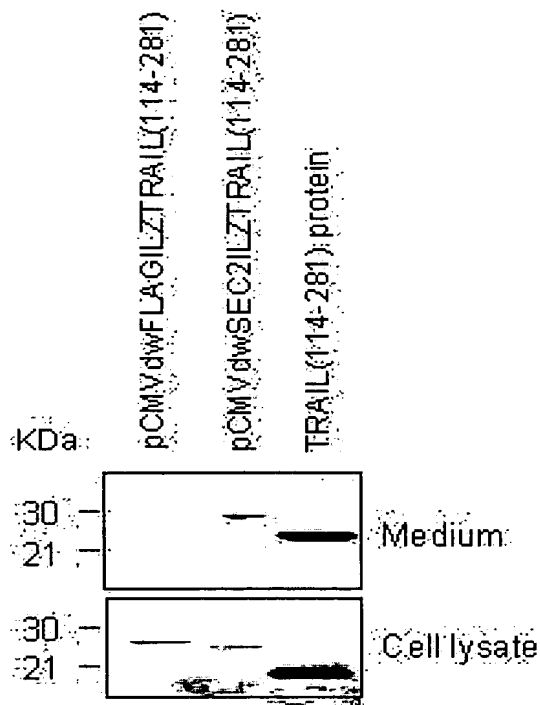
ATG GCT ACA GGC TCC CGG AGG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC CTG CCC TGG
 met ala thr gly ser arg thr ser leu leu leu ala phe gly leu leu cys leu pro top
 CTT CAA GAG GGC AGT GCC TCC GCT CGG AAC AGG CAG AAG CGC CCC GGG AGA ATG AAG CAG
 leu gh glu gly ser ala ser ala arg asn arg gh lys arg SmaI/XmaI arg met lys gh
 ATC GAG GAC AAA ATT GAG GAA ATC CTG TCC AAG ATT TAC CAC ATC GAG AAC GAG ATC GCC
 ile glu asp lys ile glu glu ile leu ser lys ile tyr his ile glu asn glu ile ala
 CGG ATT AAG AAA CTC ATT GGC GAG AGG GAA TTC GTG AGA GAA AGA GGT CCT ...
 arg ile lys lys leu ile gly gh arg EcoRI val arg gh arg gly pro

Human TRAIL(114-281) of Fig. 4

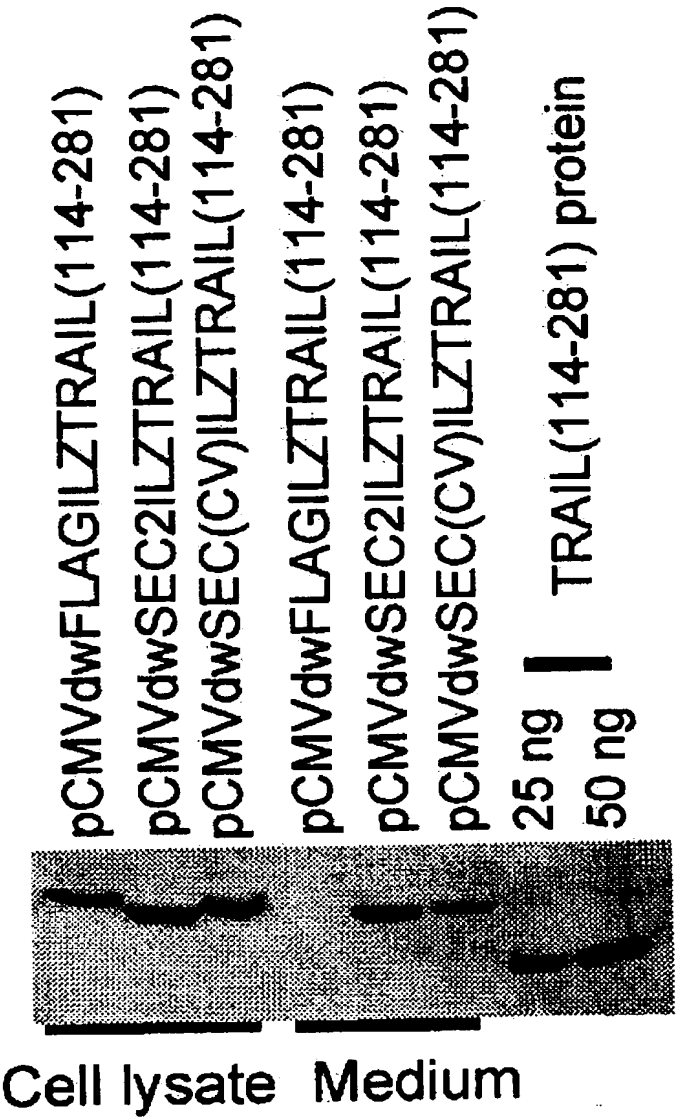
도면 8g



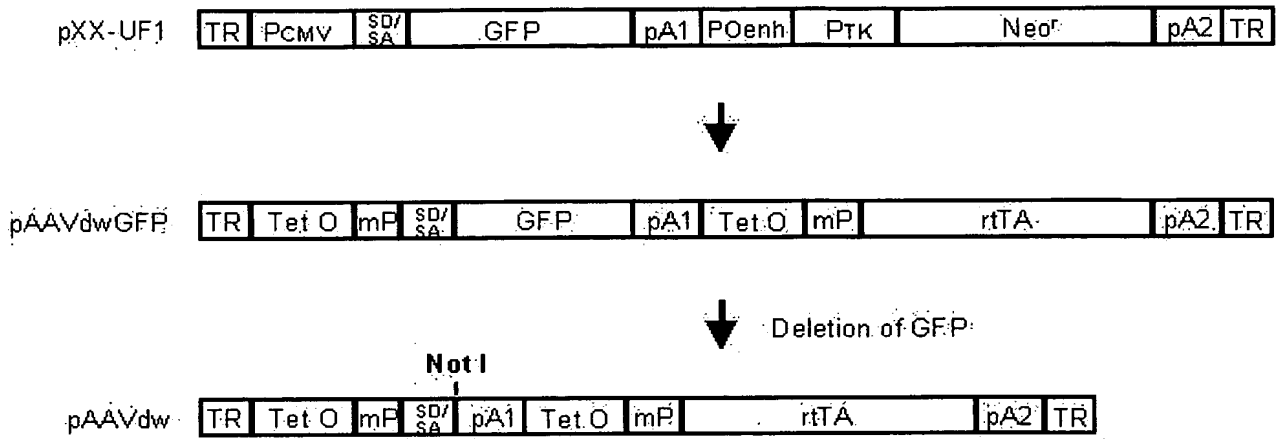
도면 9a



도면 9b



도면 10a



도면 10b

1
CGAGGGCCCTTTCGTCCTGGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTT 50
XhoI
TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGA 115
GAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACC 180
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA 245
AGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACCC 310
KpnISmaI
GGGTCGAGTAGGCGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT 375
XmaI
CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGTACCTCGATAGAAGACAGCGGGACGGATCCAGGCTCC 440
G 441

도면 10c

added 1

GGTACCCGAGGCCCTTTCGTCGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTT 50
KpnI C to ▲

TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGA 115

GAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACC 180

ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA 245

AGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGCTCGGTAGCC 310
C to ▲

GGGTCGAGTAGGCGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT 375

CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC 440

GCTCGAG 441
XhoI

added.

도면 10d

GTCGACCTCGAGTT 50
Sall XhoI

TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGA 115

GAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACC 180

ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA 245

AGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGCTCGGTACCC 310

GGGTCGAGTAGGCGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT 375

CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC 440

GCGGCCCCGAATTC 454
EcoRI

도면 10e

GAATTCAT
EcoRI

ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG CTG CTT AAT GAG GTC
Met ser arg leu asp lys ser lys val ile asn ser ah leu glu leu leu asn glu val

GGA ATC GAA GGT TTA ACA ACC CGT AAA CTC GCC CAG AAG CTT GGT GTA GAG CAG CCT ACA
gly ile glu gly leu thr thr arg lys leu ah gh lys leu gly val glu gh pro thr

CTG TAT TGG CAT GTA AAA AAT AAG CGG GCT TTG CTC GAC GCC TTA GCC ATT GAG ATG TTA
leu tyr tp his val lys asn lys arg ah leu leu asp ah leu ah ile glu met leu

GAT AGG CAC CAT ACT CAC TTT TGC CCT TTA AAA GGG GAA AGC TGG CAA GAT TTT TTA CGC
asp arg his his thr his phe cys pro leu lys gly glu ser tp gh asp phe leu arg

AAT AAC GCT AAA AGT TTT AGA TGT GCT TTA CTA AGT CAT CGC AAT GGA GCA AAA GTA CAT
asn asn ah lys ser phe arg cys ah leu leu ser his arg asn gly ah lys val his

TCA GAT ACA CGG CCT ACA GAA AAA CAG TAT GAA ACT CTC GAA AAT CAA TTA GCC TTT TTA
ser asp thr arg pro thr glu lys gh tyr glu thr leu glu asn gh leu ah phe leu

TGC CAA CAA GGT TTT TCA CTA GAG AAC GCG TTA TAT GCA CTC AGC GCT GTG GGG CAT TTT
cys gh gh gly phe ser leu glu asn ah leu tyr ah leu ser ah val gly his phe

ACT TTA GGT TGC GTA TTG GAA GAT CAA GAG CAT CAA GTC GCT AAA GAA GAA AGG GAA ACA
thr leu gly cys val leu glu asp gh glu his gh val ah lys glu glu arg glu thr

CCT ACT ACT GAT AGT ATG CCG CCA TTA TTA CGA CAA GCT ATC GAA TTA TTT GAT CAC CAA
pro thr thr asp ser met pro pro leu leu arg gh ah ile glu leu phe asp his gh

GGT GCA GAG CCA GCC TTC TTA TTC GGC CTT GAA TTG ATC ATA TGC GGA TTA GAA AAA CAA
gly ah glu pro ah phe leu phe gly leu glu leu ile ile cys gly leu glu lys gh

CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC GCG TAC AGC CGC GCG CGT ACG AAA AAC AAT TAC GGG TCT
leu lys cys glu ser gly ser ah tyr ser arg ala arg thr lys asn asn tyr gly ser

ACC ATC GAG GGC CTG CTC GAT CTC CCG GAC GAC GAC GCC CCC GAA GAG GCG GGG CTG GCG
thr ile glu gly leu leu asp leu pro asp asp asp ah pro glu glu ah gly leu ah
G to ▼

GCT CCG CGC CTG TCC TTT CTC CCC GCG GGA CAC ACG CGC AGA CTA TCG ACG GCC CCC CCG
ah pro arg leu ser phe leu pro ah gly his thr arg arg leu ser thr ah pro pro

ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT
thr asp val ser leu gly asp glu leu his leu asp gly glu asp val ala met ah his

GCC GAC GCG CTA GAC GAT TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGT CCG
ah asp ah leu asp asp phe asp leu asp met leu gly asp gly asp ser pro gly pro

GGA TTT ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC GAG TTT
gly phe thr pro his asp ser ala pro tyr gly ah leu asp met ala asp phe glu phe

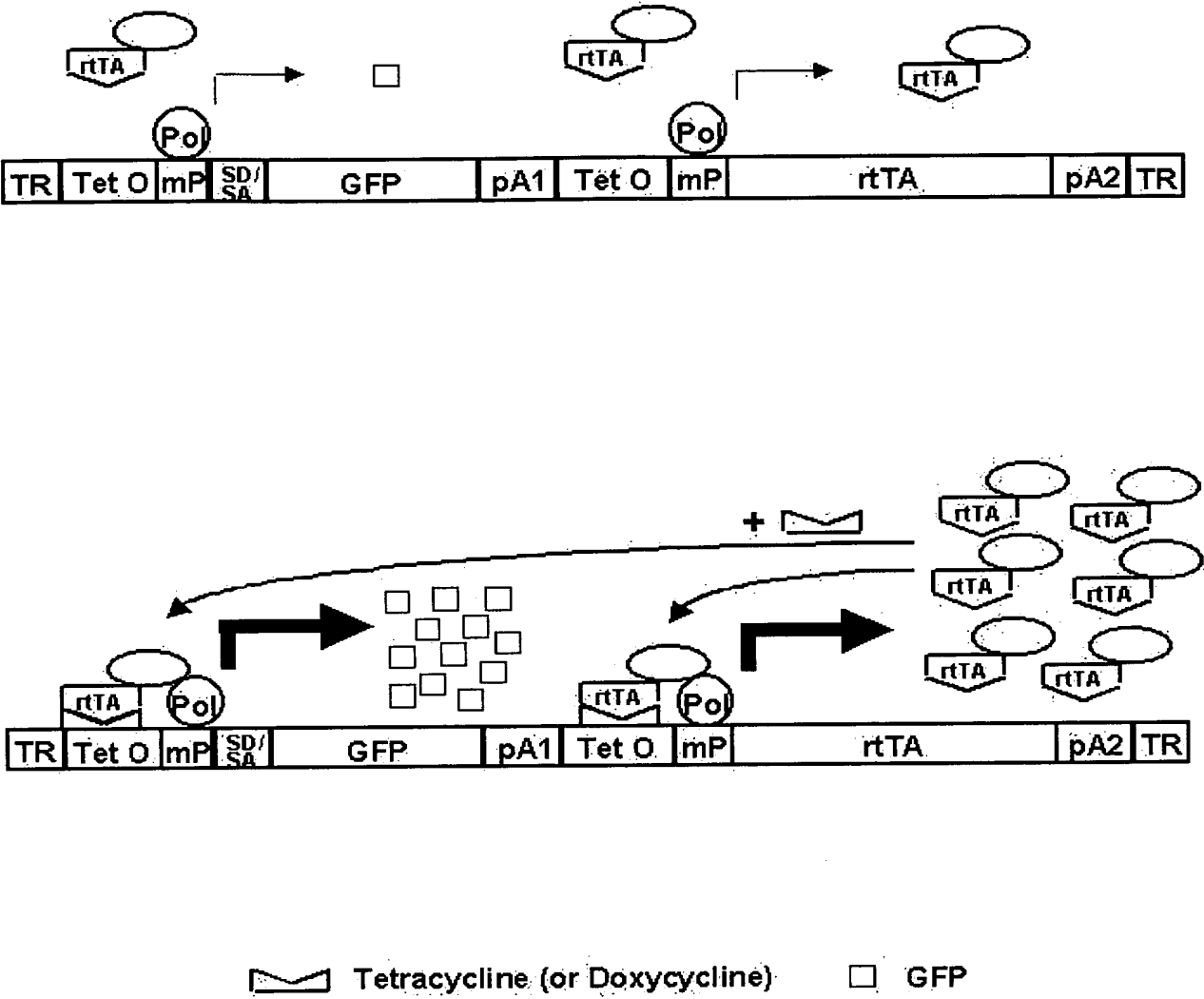
GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT GGG TAG GGGGCGGAGGATCC
glu gh met phe thr asp ala leu gly ile asp glu tyr gly gly Bam HI

도면 10f

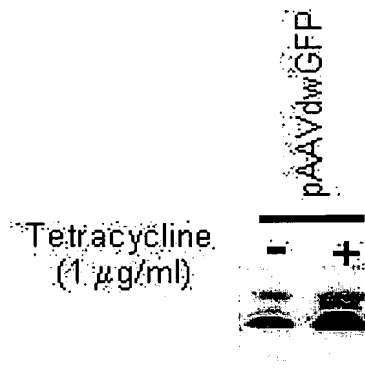
	<u>GTCGACCTCGAGTT</u>	50
	Sall XhoI	
TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGA		115
GAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACC		180
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA		245
AGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACCC		310
GGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGAT		375
CGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC		440
454 ▼		
GCGGCCCCGAATTCAT ATG TCT AGA TTA GAT AAA ...GGATCCAGACATGATGTCGAC		
EcoRI	met ser arg leu asp lys BamHI Sall	

DNA encoding rtTA ORF of Fig. 10e

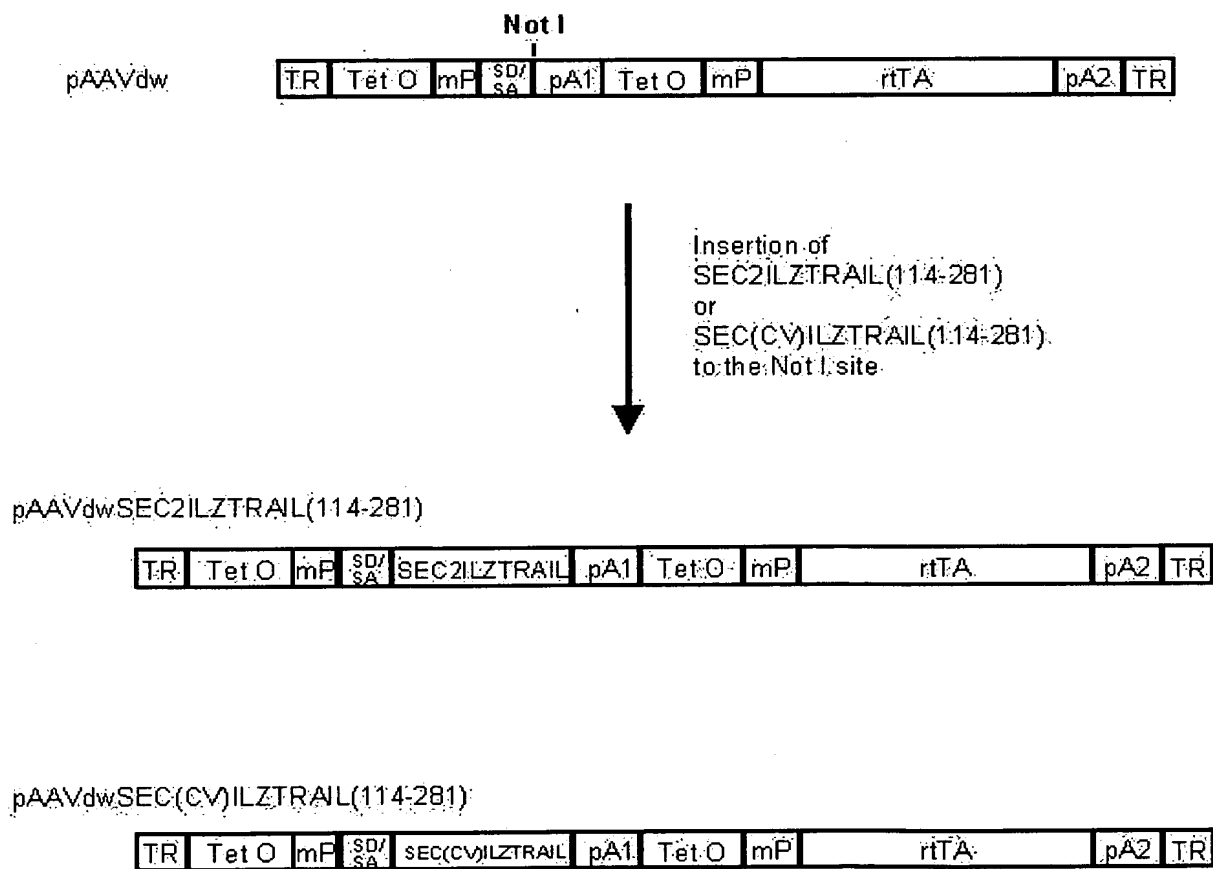
도면 10g



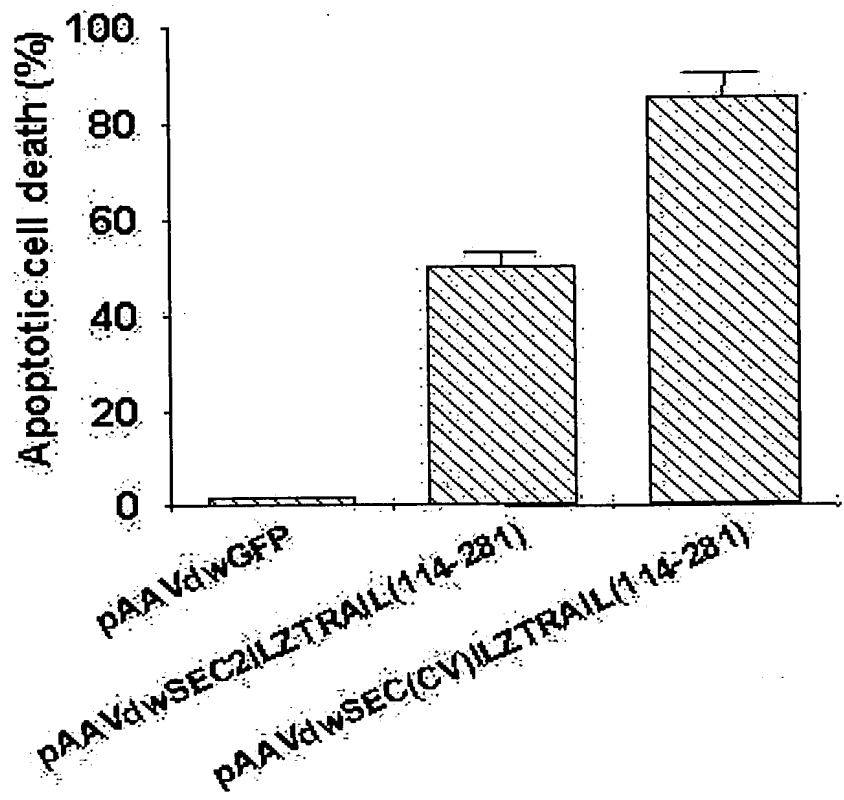
도면 10h



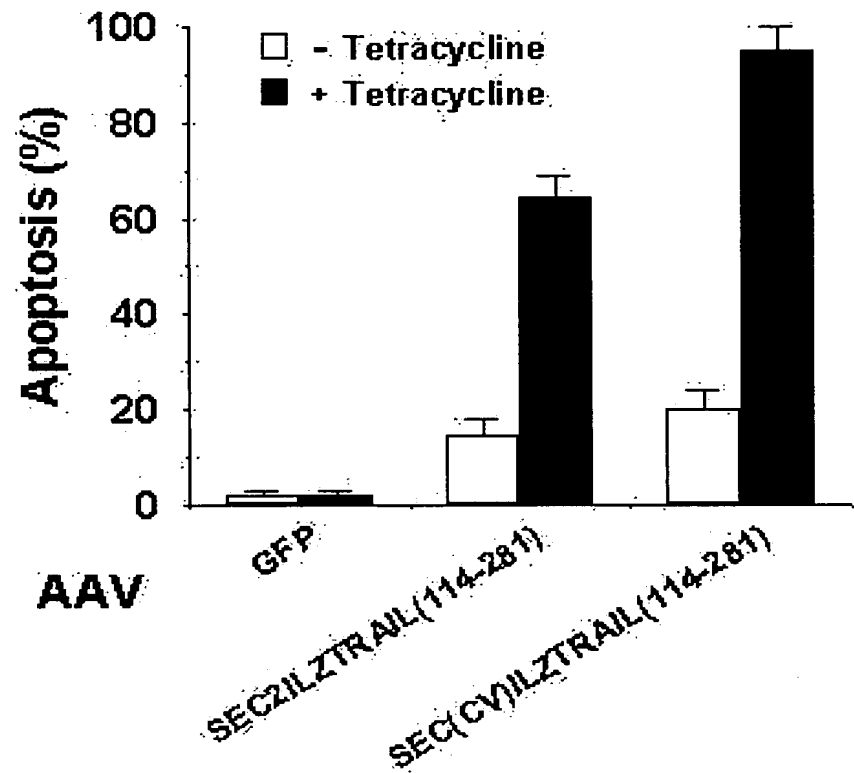
도면 11a



도면 11b



도면 12



도면 13

Cell line	p53 status	Apoptotic cell death (%) induced by		
		TRAIL	TRAIL + Act D	Act D
HeLa	wt (HPV)	>90	ND	ND
MCF-7	wt	>90	ND	ND
A549	wt	30	>98	0
PANC-1	mt	>90	ND	ND
SK-OV-3	mt	30	>98	0
HepG2	mt	30	>98	0
Hep3B	mt	25	>98	0
PLC/PRF/5	mt	25	>98	0

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.